



Patrícia Carrasquinho Pires Cabral

Licenciada em Dietética e Nutrição

**Fermentação de *Brassica oleracea* com
Salicornia ramosissima para reduzir o
conteúdo de sal**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Ciências Gastronómicas

Orientador: Professora Doutora Célia Maria Brito
Quintas, Professora Coordenadora, ISE/UAlg

Presidente: Professora Doutora Paulina Mata, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Arguente: Professora Doutora Manuela Guerra, Professora Coordenadora, ESHTe



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2018

2018

Fermentação de *Brassica oleracea* com *Salicornia ramosissima* para reduzir o conteúdo de sal
Patrícia Carrasquinho Pires Cabral



INSTITUTO
SUPERIOR DE
AGRONOMIA
Universidade de Lisboa



Patrícia Carrasquinho Pires Cabral

Licenciada em Dietética e Nutrição

**Fermentação de *Brassica oleracea* com
Salicornia ramosissima para reduzir o
conteúdo de sal**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Ciências Gastronómicas

Orientador: Professora Doutora Célia Maria Brito Quintas,
Professora Coordenadora, ISE/UAlg

Setembro, 2018

Fermentação de *Brassica oleracea* com *Salicornia ramosissima* para reduzir o conteúdo de sal

© Patrícia Carrasquinho Pires Cabral, FCT/UNL e UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*Dedico este trabalho ao meu maior ídolo,
a Mulher mais forte do Mundo,
a minha Mãe*

Muito Obrigada por tudo Mãe!

Adoro-te!

Agradecimentos

Este trabalho representa o fruto de dois anos de estudo e dedicação que só foi possível realizar com o apoio, amizade e generosidade de algumas pessoas, a quem quero sinceramente agradecer.

A frequência do curso de mestrado em Ciências Gastronómicas veio contribuir para o desenvolvimento dos conhecimentos adquiridos previamente na licenciatura em Dietética e Nutrição. A área dos alimentos fermentados, que constituiu uma unidade curricular de base deste curso de mestrado, revelou-se particularmente interessante, não só pela ciência em si, mas também pela forma com que foi ensinada, daí o meu agradecimento à Professora Doutora Cristina Prista. A vontade de aprender, trabalhar e desenvolver um novo produto nesta área temática dos alimentos foi desencadeada pela curiosidade despertada no âmbito da unidade curricular de desenvolvimento de novos produtos lecionada pela Professora Doutora Paulina Mata, a quem agradeço. Com o tempo, tornou-se claro que o trabalho a realizar no âmbito da dissertação de mestrado seria o desenvolvimento de um produto fermentado. Mantinha-se, contudo, a vontade de seguir uma orientação antiga, de procurar investir na reformulação de um alimento com valor acrescentado e mais saudável. A redução do teor de sal nos alimentos é atualmente um dos grandes desafios da engenharia alimentar e foi com este intuito que delínei o meu trabalho. Tinha também vontade de voltar ao Algarve. Decidi por isso, pedir orientação à Professora Doutora Célia Quintas, da Universidade do Algarve com interesses e experiência em alimentos fermentados de origem vegetal.

E, foi assim que tudo começou...

À minha orientadora, Professora Doutora Célia Quintas cabe o primeiro lugar no reconhecimento pelo que me transmitiu ao longo de todas as fases deste trabalho. Agradeço a disponibilidade na orientação e o apoio incondicional, o ensinamento prestado, a paciência demonstrada quando cometia erros e os conselhos que me dava na solução dos mesmos e em especial a sua amizade.

*À RiaFresh agradeço a disponibilidade e o fornecimento de *Salicornia ramosíssima* fresca.*

À Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa e ao Instituto Superior de Agronomia por me terem dado a oportunidade de frequentar o curso de Mestrado em Ciências Gastronómicas.

Ao Instituto Superior de Engenharia da Universidade do Algarve, por me ter acolhido e proporcionado a realização deste trabalho de dissertação de mestrado.

*Aos Professores do Departamento de Engenharia Alimentar, que me apoiaram e me fizeram sentir *em casa*, especialmente ao Professor Doutor Rui Cruz pela sempre presente boa disposição, paciência e ajuda na realização de algumas técnicas*

laboratoriais, à Professora Doutora Ludovina Galego pela disponibilidade demonstrada no ensino e execução de certas técnicas de análise, à Professora Doutora Margarida Vieira pela sua alegria, apoio e companhia quando participei no 5th International ISEKI_Food Conference em Estugarda (3-5/2018), com uma comunicação sob a forma de painel intitulada “Fermentation of Brassica oleracea L. with the halophyte plant Salicornia ramosissima L.” (Book of Abstracts, #226, p. 278).

Ao pessoal técnico dos laboratórios de microbiologia, química e processamento, Engenheira Neusa Rodrigues, Engenheira Vera Gonçalves e Engenheira Clarisse Ramalho, por me terem apoiado na realização de certas técnicas de análise.

A todos os que se mostraram disponíveis para a realização das provas de análise sensorial.

Aos mestrandos, estagiários e bolsiros do ISE, Daniela Silva, Ana Raquel e Vera Santos, Olívia Bujor e Guilherme Santos, e, Ana Margarida Graça por me terem acompanhado e apoiado ao longo deste percurso.

A todos os Professores do Mestrado em Ciências Gastronómicas, pelos ensinamentos que me facultaram.

Aos meus amigos, que apesar de distantes, sempre me confortaram com uma palavra calorosa, principalmente à Ana Rita Correia, à Inês Pontes, à Mariana Mascarenhas, à Jéssica Cruz, à Abigail Salgado, e ao Hélder Madeira.

Ao meu pai, irmãos e avós e pela sua presença constante, pelo seu amor incondicional e por terem acreditado sempre em mim e não me terem deixado fraquejar nos momentos mais difíceis.

E por último, estou infinitamente agradecida à minha mãe, que apesar de doente, me apoiou incessantemente, me ensinou a lutar pelo que quero, a ser mais ambiciosa e mais forte. Foi graças a ela que consegui realizar o meu percurso académico com sucesso, sem ela não teria chegado tão longe! Foi o meu porto de abrigo, o meu pilar e o meu guia. Foi, é, e sempre será o meu maior ídolo!

Muito Obrigada!

Resumo

Este trabalho teve como objetivo estudar a fermentação ácido-láctica de couve branca (*Brassica oleracea*) utilizando como substituto total ou parcial do NaCl, a planta halófita salicórnica (*Salicornia ramosissima*). Estudou-se a variação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos ao longo das fermentações e caracterizou-se organolética e nutricionalmente os produtos finais. Delinearam-se três fermentações de couve: A, com 2,91% de sal (~1,15% Na) (controle); B, com salicórnica (~1,56% de sal equivalente, ~0,34% Na); e C, com sal e salicórnica (~1,94% de sal equivalente, ~0,49% Na). Posteriormente, preparou-se outra fermentação, D, de couve com sal, salicórnica e CaCl_2 (~2,93% de sal equivalente, ~0,49% Na). Ao longo das fermentações observou-se uma descida do pH (<4) e uma subida da acidez (~1,0%), um aumento seguido de estabilização das populações de mesófilos (5,5-7,2 Log UFC/g) e bactérias ácido-láticas (5,4-6,6 Log UFC/g) e o desaparecimento dos fungos e coliformes. Não foram detetadas *Escherichia coli* e *Salmonella*. O teor em compostos fenólicos e a atividade antioxidante aumentou com a fermentação, sendo significativamente maior na couve ácida C (37,3mg ác gálico/100g e 3,63mmol Trolox/100 g, respetivamente). Não se detetaram diferenças significativas entre os fermentados, relativamente aos atributos sensoriais com exceção da dureza e do teor de sal, sendo A a mais salgada e mais dura, B a menos dura e C a menos salgada. A couve ácida C obteve a melhor classificação sensorial. Nutricionalmente, a couve ácida C era semelhante ao chouxcroute comercial, apresentando uma redução de aproximadamente 50% de sódio relativamente ao controle. A adição de CaCl_2 resultou numa couve ácida D com dureza superior à couve C, não se distinguindo organoleticamente das outras. A fermentação de couve com sal e salicórnica permite obter um produto final com menor teor de NaCl e características nutricionais, microbiológicas e sensoriais semelhantes às obtidas no ensaio controle.

Palavras chave: Couve branca fermentada; Salicórnica; Redução de NaCl; Segurança microbiológica; Características nutricionais e sensoriais

Fermentation of *Brassica oleracea* with *Salicornia ramosissima* to reduce the salt content

Abstract

This work aimed to study the lactic-acid fermentation of white cabbage (*Brassica oleracea*) replacing the NaCl content, totally or partially, with the halophyte salicornia (*Salicornia ramosissima*). The fermentation was followed by the analysis of the physicochemical and microbiological parameters. At the end, the products were characterized organoleptically and nutritionally. Three fermentation trials of white cabbage were done: A, with 2.91% salt (~1.15% Na) (control); B, with salicornia (~1.56% salt equivalent, ~0.34% Na); and C, with salt and salicornia (~1.94% salt equivalent, ~0.49% Na). Then, another fermentation, D, was done with salt, salicornia and CaCl₂ (~2.93% equivalent salt, ~0.49% Na). Throughout the fermentations, a decrease in pH (< 4) and a rise in acidity (~1.0%) were observed in all experiments. There was an increase, followed by a stabilization, of the mesophilic (5.5-7.2 Log CFU/g) and lactic-acid bacteria populations (5.4-6.6 Log UFC/g), and a decrease and disappearance of the fungi and coliforms. *Escherichia coli* and *Salmonella* were not detected. The content of phenolic compounds and antioxidant activity increased with fermentation, being significantly higher in C fermented cabbage (37.3mg galic ac/100g and 3.63 mmol Trolox /100g, respectively). The sensory analysis revealed no significant differences between products, except for hardness and salt content, with A being the saltiest and hardest, B the least hard and C the least salty. Fermented cabbage C had the best sensory classification. Nutritionally, it was similar to commercial sauerkraut but with approximately 50% reduction of sodium. The addition of CaCl₂ resulted in a final product, D, with a harder texture than C, but not organoleptically different from the others. The fermentation of cabbage with salt and salicornia yields a final product with similar quality to the control assay, regarding physicochemical, microbiological and sensorial characteristics, but with a reduction of NaCl content.

Keywords: Fermented white cabbage, Salicornia, Reduction of NaCl, Microbial safety, Nutritional and sensorial characteristics

Índice Geral

Direitos de Cópia.....	iii
Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Índice Geral.....	xiii
Índice de Figuras.....	xv
Índice de Tabelas.....	xvii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Enquadramento do Tema	3
1.2 A Fermentação de Vegetais e os Benefícios na Saúde	3
1.3 Chouxcroute – Couve Fermentada Ácida	6
1.3.1 História da Produção e Consumo de Chouxcroute	6
1.3.2 Caracterização de Chouxcroute	7
1.3.3 Processamento de Chouxcroute.....	8
1.4 Consumo de Sal e Saúde.....	12
1.5 Chouxcroute com Baixo Teor de Sal	13
1.5.1 <i>Salicornia ramosissima</i> L.....	14
1.6 Objetivos	16
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1 Materiais.....	21
2.2 Métodos	21
2.2.1 Preparação da Couve a Fermentar	21
2.2.2 Delineamento Experimental.....	21
2.2.3 Momentos de Amostragem.....	22
2.2.4 Análises Físico-químicas	22
2.2.4.1 pH.....	22
2.2.4.2 Acidez.....	23
2.2.4.3 Atividade da água (a_w).....	23
2.2.4.4 Salinidade.....	23
2.2.4.5 Sólidos Solúveis Totais (SST).....	23
2.2.4.6 Cor.....	23
2.2.4.7 Textura.....	23
2.2.4.8 Compostos Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante.....	24
2.2.5 Análises Microbiológicas	25

2.2.5.1 Contagem de Microrganismos Mesófilos Aeróbios.....	25
2.2.5.2 Contagem de Bactérias Ácido-Láticas (BAL).....	25
2.2.5.3 Contagem de Fungos e Leveduras.....	25
2.2.5.4 Contagem de Coliformes Totais.....	25
2.2.5.5 Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivos.....	26
2.2.5.6 Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.....	26
2.2.5.7 Contagem de <i>Escherichia coli</i>	26
2.2.6 Análises Sensoriais	26
2.2.7 Análises Nutricionais	27
2.2.7.1 Determinação do Resíduo Seco e Teor de Humidade.....	27
2.2.7.2 Determinação do Teor em Lípidos.....	27
2.2.7.3 Determinação do Teor em Fibra.....	27
2.2.7.4 Determinação de Teor em Proteína.....	28
2.2.7.5 Determinação do Teor em Cinzas.....	29
2.2.7.6 Determinação do Teor em Hidratos de Carbono.....	29
2.2.7.7 Determinação do Valor Calórico.....	29
2.2.7.8 Determinação do Teor em Minerais (Na, K e Ca).....	29
2.2.8 Análise Estatística	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1 Evolução da Fermentação	33
3.1.1 pH e Acidez do Exsudado da Couve	33
3.1.2 Parâmetros da Cor	34
3.1.3 Microbiota.....	36
3.2 Couve Ácida Obtida por Fermentação	40
3.2.1 Caracterização Físico-química.....	40
3.2.2 Caracterização Organolética	44
3.2.3 Caracterização Nutricional.....	46
3.3 Efeito da Adição de CaCl_2 na Fermentação e Qualidade da Couve Ácida	47
4. CONCLUSÃO	55
5. PERSPETIVAS DE TRABALHOS FUTUROS	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS.....	73
ANEXO I.....	75
ANEXO II.....	79

Índice de Figuras

Figura 1.1	Processamento de chouxroute.....	10
Figura 3.1	Variação do pH e da acidez do exsudado durante a fermentação de couve branca nas experiências: A – ensaio controlo realizado com sal de mesa; B – ensaio realizado com salicórnia; C – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia.....	34
Figura 3.2	Variação dos parâmetros da cor, luminosidade L (3.2i), graduação da cor verde/vermelho a (3.2ii) e tonalidade h (3.2iii) durante a fermentação de couve branca nas experiências: A – ensaio controlo realizado com sal de mesa; B – ensaio realizado com salicórnia; C – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia.....	36
Figura 3.3	Variação da população de microrganismos mesófilos aeróbios durante a fermentação de couve branca nas experiências: A – ensaio controlo realizado com sal de mesa; B – ensaio realizado com salicórnia; C – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia.....	37
Figura 3.4	Variação da população de bactérias ácido-lácticas (BAL) durante a fermentação de couve branca nas experiências: A – ensaio controlo realizado com sal de mesa; B – ensaio realizado com salicórnia; C – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia.....	38
Figura 3.5	Variação da população de fungos filamentosos e leveduras durante a fermentação de couve branca nas experiências: A – ensaio controlo realizado com sal de mesa; B – ensaio realizado com salicórnia; C – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia.....	39
Figura 3.6	Variação da população de coliformes totais durante a fermentação de couve branca nas experiências: A – ensaio controlo realizado com sal de mesa; B – ensaio realizado com salicórnia; C – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia.....	40
Figura 3.7	Avaliação organolética das couves ácidas fermentadas nas experiências A – ensaio controlo realizado com sal de mesa; B – ensaio realizado com salicórnia e C – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia e de chouxroute comercial.....	45
Figura 3.8	Variação do pH e da acidez do exsudado durante a fermentação de couve branca nas experiências: A' – ensaio controlo realizado com sal de mesa; C' – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia; D – ensaio realizado com sal de mesa, salicórnia e CaCl_2	47
Ffigura 3.9	Variação dos parâmetros da cor, luminosidade L (3.9i), graduação da cor verde/vermelho a (3.9ii) e tonalidade h (3.9iii) durante a fermentação de couve branca nas experiências: A' – ensaio controlo realizado com sal de mesa; C' – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia; D – ensaio realizado com sal de mesa, salicórnia e CaCl_2	49
Figura 3.10	Variação da população de microrganismos mesófilos aeróbios durante a fermentação de couve branca nas experiências: A' – ensaio controlo realizado com sal de mesa; C' – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia; D – ensaio realizado com sal de mesa, salicórnia e CaCl_2	50

Figura 3.11 Variação da população de bactérias ácido-láticas durante a fermentação de couve branca nas experiências: A' – ensaio controlo realizado com sal de mesa; C' – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia; D – ensaio realizado com sal de mesa, salicórnia e CaCl_2	50
Figura 3.12 Variação da população de fungos filamentosos e leveduras durante a fermentação de couve branca nas experiências: A' – ensaio controlo realizado com sal de mesa; C' – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia; D – ensaio realizado com sal de mesa, salicórnia e CaCl_2	51
Figura 3.13 Variação da população de coliformes totais durante a fermentação de couve branca nas experiências: A' – ensaio controlo realizado com sal de mesa; C' – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia; D – ensaio realizado com sal de mesa, salicórnia e CaCl_2	51
Figura 3.14 Avaliação organolética das couves ácidas fermentadas nas experiências A' – ensaio controlo realizado com sal de mesa; C' – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia; D - ensaio realizado com sal de mesa, salicórnia e CaCl_2 e de chouxcroute comercial.....	53

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 Codificação das experiências/fermentações, ingredientes, % sal equivalente e Na total.....	22
Tabela 2.2 Calendarização das análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.....	22
Tabela 3.1 Características físico-químicas da couve ácida obtida por fermentação nas experiências A – ensaio controlo realizado com sal de mesa (2,91% sal equivalente); B – ensaio realizado com salicórnia (1,56% sal equivalente) e C – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia (1,94% sal equivalente).....	41
Tabela 3.2 Composição nutricional da couve ácida fermentada com sal e salicórnia - ensaio C; da couve fresca e da salicórnia (por 100 g, média \pm desvio padrão).....	46
Tabela 3.3 Características físico-químicas da couve ácida obtida por fermentação nas experiências A – ensaio controlo realizado com sal de mesa (2,91% sal equivalente); C – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia (1,94% sal equivalente); D – ensaio realizado com sal de mesa, salicórnia e CaCl_2 (2,93% sal equivalente).....	52

Lista de Abreviaturas e Siglas

<i>a</i>	Graduação dos tons de verde (-100) a vermelho (+100)
ALA	Ácido-gordo α -linoleico
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
ANOVA	Análise de variância
APT	Água Peptonada Tamponada
<i>a_w</i>	Atividade da água
<i>b</i>	Graduação dos tons de azul (-100) a amarelo (+100)
BAL	Bactérias ácido-lácticas
BP	Baird Parker Agar
<i>c</i>	Saturação ou vivacidade da cor
DPA	Ácido-gordo Docosapentanoico
DPPH*	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DRBC	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol
EC₅₀	Concentração do composto que induz metade do efeito máximo
EPA	Ácido-gordo Eicosapentanoico
Eq.	Equação
FAO	Food Agriculture Organization
Fig.	Figura
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
<i>h</i>	Tonalidade da cor
IA	Índice de Arterogenicidade
IT	Índice de Trombogenicidade
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
<i>L</i>	Luminosidade, variando de preto (0) a branco (+100)
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de baixa densidade)
MRS	Man Rogosa and Sharpe Agar
MKTTn	Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth
NrF₂	NFE2L2: regulador das respostas ao stress oxidativo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	Plate Count Agar
SST	Sólidos Solúveis Totais
UFC	Unidade Formadora de Colónias
USDA	United States Department of Agriculture
TBX	Chromocult Triptone Bile x-glucuronide
var.	Variedade
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate Agar

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento do Tema

As couves ácidas, tais como o chouxcroute, são alimentos fermentados originários dos Países Asiáticos e Extremo Oriente. Tratam-se de alimentos resultantes da fermentação ácido-láctica de folhas de certas variedades de *Brassica oleracea* L. (couve branca/repolho), por adição direta de sal (cloreto de sódio). São bastante consumidos nos Países Asiáticos, no norte da Europa, nos Estados Unidos e Canadá, geralmente como acompanhamento de carnes fumadas ou enchidos.

Atualmente, o consumo de sal é muito elevado. De acordo com a Organização Mundial de Saúde cada pessoa consome em média 9 a 12 g de sal por dia, sendo o valor máximo recomendado de 5 g de sal, correspondendo a 2 g de sódio. Adicionalmente, esta organização preconiza o consumo de pelo menos 3,5 g de potássio por dia. Uma elevada concentração de sódio e uma baixa concentração de potássio na corrente sanguínea pode conduzir a situações graves de hipertensão e risco de doenças cardiovasculares (OMS, 2016). As autoridades de saúde advogam a redução da ingestão de sódio devido ao seu impacto negativo sobre a saúde, pelo que a reformulação do processamento de alimentos com menor quantidade de sódio deve ser uma preocupação constante.

Vários estudos têm mostrado que é viável a produção de chouxcroute com uma boa qualidade microbiológica e características sensoriais esperadas, por fermentação em salmouras onde o NaCl foi substituído parcial ou totalmente por outros sais minerais, como cloretos de potássio, de cálcio e de magnésio (Viander, Maki & Palva, 2003; Wolkers-Rooijackers, Thomas & Nout, 2013; Xiong, Li, Guan, Peng & Xie, 2014).

O objetivo principal deste trabalho foi produzir uma couve fermentada ácida com menor teor de sódio que o chouxcroute tradicional, por substituição total ou parcial do sal, usando salicórnia.

A salicórnia (*Salicornia ramosissima* L.) é uma planta halófita que cresce em ambientes salinos, composta maioritariamente por água, com níveis consideráveis de fibra, proteína, ácidos-gordos polinsaturados, particularmente ácido linoleico, 18 aminoácidos essenciais, micronutrientes, nomeadamente vitamina C e β -caroteno e minerais Na, Mg, Ca, K e P (Barreira, Resek, Rodrigues, Rocha, Pereira, Bandarra et al., 2017). Prevê-se que a utilização de salicórnia na produção de couve fermentada ácida permita não só reduzir a quantidade de sódio no produto final, mas também enriquecê-lo com outros minerais e fibra alimentar.

Neste trabalho, foram realizadas várias experiências de fermentação de couve, utilizando salicórnia ou combinações de sais e salicórnia. A evolução das fermentações foi acompanhada pelo estudo da variação de vários parâmetros físico-químicos e microbiológicos. A qualidade dos produtos finais obtidos foi avaliada a nível físico-químico, microbiológico, nutricional e sensorial.

1.2 A Fermentação de Vegetais e os Benefícios na Saúde

Os alimentos de origem vegetal são caracterizados por possuírem um elevado teor em água, um baixo teor de gordura e um baixo valor calórico. São fontes de compostos nutricionalmente

importantes, tais como fibras, vitaminas, principalmente vitaminas C e K, minerais, especialmente potássio e cálcio, compostos fenólicos, incluindo os flavonoides, fitoestrogénos, compostos de enxofre, monoterpenos e péptidos bioativos (Septembre-Malaterre, Remize & Poucheret, 2018). Estes compostos bioativos são considerados moléculas com potencial terapêutico e impacto positivo sobre várias condições crónicas, tais como a obesidade, a diabetes, o cancro e as doenças cardiovasculares e neuro-degenerativas (Leite, Malta, Riccio, Eberlin, Pastore & Maróstica Júnior, 2011).

Uma dieta alimentar rica em vegetais está associada a benefícios na saúde e o seu consumo é objeto de recomendações nutricionais, sugerindo que devem constituir metade da porção no prato (Septembre-Malaterre, et al., 2018).

Os teores de nutrientes e compostos bioativos nos vegetais dependem da variedade, do grau de maturação, das condições climatéricas e das práticas agronómicas, assim como do processamento e armazenamento a que são submetidos (Björkman, Klingen, Birch, Bones, Bruce, Johansen et al., 2011). Após a colheita e principalmente depois de cortados, os vegetais deterioram-se rapidamente devido ao crescimento de microrganismos e à ocorrência de reações endógenas (Barth, Hankinson, Zhuang, Breid & Breidt, 2009). De forma a prolongar o tempo de vida útil, os vegetais são geralmente submetidos a transformações tecnológicas, que conduzem a alterações na sua composição. A fermentação é um dos processos de preservar os vegetais, modificando a sua composição bioquímica, o seu valor nutricional e conferindo características sensoriais agradáveis aos produtos finais (Septembre-Malaterre, et al., 2018).

Nos países ocidentais, os alimentos fermentados têm sido objeto de renovado interesse, devido a várias razões: (i) a preocupação dos consumidores com a dieta alimentar, procurando um padrão nutricionalmente mais saudável; (ii) a segurança alimentar que os produtos fermentados apresentam, por resultarem de um processo natural em que o risco de contaminação biológica é limitado; (iii) a modificação organolética do alimento, com o desenvolvimento de novos aromas, texturas e sabores; (iv) a simplicidade da sua preparação, já que a fermentação decorre autonomamente, envolvendo um número limitado de operações unitárias; (v) a valorização de material vegetal desperdiçado pela indústria alimentar e (vi) o baixo custo do processo de fermentação, que é energeticamente compatível com um desenvolvimento sustentável (Motarjemi, 2002; Marco, Heeney, Binda, Cifelli, Cotter, Foligné et al., 2017).

Segundo vários autores, os alimentos fermentados representam um meio de diminuir o risco e a gravidade de doenças associados ao estilo de vida ocidental através de um acréscimo no valor nutricional e funcional dos alimentos consumidos (Stanton, Ross, Fitzgerald & Sinderen, 2005).

A fermentação de um produto vegetal ocorre devido à presença de um consórcio microbiano de diferentes géneros e espécies. Em qualquer produto vegetal existe uma grande variedade de microrganismos, tais como leveduras (*Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* e *Rhodotorula*), fungos filamentosos, bactérias Gram negativas, como pseudomonas, flavobacterias e enterobactérias (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*), bactérias Gram positivas aeróbias (*Bacillus*), anaeróbias

(*Clostridium*), e bactérias ácido-láticas (BAL) (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*). De entre a vasta microbiota, as bactérias dos géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus* e da espécie *Escherichia coli* encontram-se em maior quantidade, podendo atingir 10^7 células por grama de vegetal, enquanto que as BAL podem atingir valores de 10^3 células por grama de vegetal. Devido à grande diversidade microbiana e à diferença numérica entre os diversos grupos microbianos que coexistem nos vegetais é necessário criar condições favoráveis ao crescimento das BAL, como a adição de sal, o controlo da temperatura e a anaerobiose do ambiente, para propiciar a fermentação ácido-láctica (Hutkins, 2006). Entre os vegetais fermentados mais populares, o chouxcroute, resultante da fermentação da couve branca/repolho é um dos produtos principais (Kusznierewicz, Bartoszek, Wolska, Drzewiecki, Gorinstein & Namieśnik, 2008).

Ao longo da fermentação de produtos vegetais são produzidos vários compostos, como ácidos orgânicos, dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrogénio, ácidos-gordos, ácido fenilacético, bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos, que contribuem para preservar os alimentos e diminuir o risco de possíveis contaminações (Swain, Anandharaj, Ray & Rani, 2014). O processo de fermentação confere novas texturas e sabores e aromas agradáveis ao produto final que são completamente diferentes dos da matéria-prima utilizada, permitindo também reduzir ou eliminar fatores anti-nutricionais provenientes da mesma, que geralmente interferem na assimilação de alguns nutrientes, como oxalatos, proteases e inibidores de α -amilase, lectinas, taninos condensados e ácido fítico (Swain et al., 2014; Patra, Das, Paramithiotis & Shin, 2016).

Os alimentos fermentados são ricos em vitaminas, minerais e hidratos de carbono e apresentam vários compostos prébióticos que estimulam o crescimento de microrganismos probióticos. Exemplos de prébióticos são os oligossacarídeos (ex.: inulina) existentes nos alimentos, que não são digeridos pelo organismo humano. Ao chegarem ao cólon, os prébióticos são usados como substrato pelo microbioma intestinal para produzir energia, metabolitos e micronutrientes, que são posteriormente utilizados pelo organismo do hospedeiro. Os prébióticos têm como função estimular o crescimento seletivo de certas espécies benéficas de microrganismos, principalmente bifidobactérias e lactobacilos (Corzo, Alonso, Azpiroz, Calvo, Cirici, Leis, et al., 2015). De acordo com a Food Agriculture Organization (FAO), os probióticos são definidos como um conjunto de microrganismos vivos, que quando são consumidos nas quantidades adequadas, apresentam benefícios para a saúde do consumidor (Swain et al., 2014). Por esta razão, acredita-se que o consumo de alimentos fermentados pode, em certa medida, apresentar mais vantagens para a saúde do que a matéria-prima que lhes deu origem. Na verdade, vários estudos referem que o consumo de alimentos fermentados diminui os riscos de contrair doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, cirrose hepática e previne a obesidade, diarreias, artrite, esclerose, depressão e outras doenças do foro psicológico, podendo ainda alterar positivamente o estado emocional (Swain et al., 2014; Patra et al., 2016; Hill, Sugrue, Arendt, Hill, Stanton & Ross, 2017). Alguns aminoácidos e derivados com funções neurotransmissoras (por exemplo o ácido γ -aminobutírico) e imunomoduladoras podem também ser produtos da fermentação (Becerra-Tomas, Guasch-Ferre, Quilez, Merino, Ferre, Diaz-Lopez, et al., 2015), assim como certas proteínas e exopolissacáridos com capacidade antioxidante (Li, Ji, Chen,

Jiang, Rui & Dong, 2014; Hong, Lee, Jung, Jang, Chung & Kim, 2015). Pigmentos como flavonoides, licopenos, antocianinas, β -caroteno, glucosinolatos e os produtos derivados resultantes da sua decomposição durante a fermentação, estão igualmente presentes nos vegetais fermentados e podem atuar como antioxidantes eliminando radicais livres nocivos envolvidos em doenças degenerativas como o cancro, a artrite e o envelhecimento (Kaur & Kapoor, 2001). O chouxroute, por exemplo, contém s-metil-metionina que está associada à redução da formação de tumores no estômago (Tamang, Shin, Jung & Chae, 2016), podendo prevenir a aderência de agentes patogénicos à mucosa intestinal e conferir atividade imunoestimulante ou hipocolesterolémica (Swain et al., 2014; Marco, et al., 2017).

Um dos principais produtos finais da fermentação láctica é o ácido-láctico, que apresenta funções importantes no organismo pois melhora a utilização do cálcio, do fósforo e do ferro e facilita a adsorção do ferro e da vitamina D (Swain et al., 2014). Durante a fermentação ácido-láctica a atividade das BAL promove a produção de piranoantocianidinas que vão ativar o fator de transcrição Nrf2 (NFE2L2 – regulador das respostas ao stress oxidativo) e induzir a expressão de enzimas antioxidantes e desintoxicantes para protegerem o organismo de danos químicos e oxidativos (Bay, Findlay, Sanchez Maldonado, Schieber, Vederas & Gänzel, 2014; Senger, Li, Jaminet & Cao, 2016).

1.3 Chouxroute – Couve Fermentada Ácida

1.3.1 História da Produção e Consumo de Chouxroute

O processo de fermentação é uma prática antiga usada para preservar os alimentos, nomeadamente a fruta e os vegetais, durante os tempos de fome, seca e frio (Swain et al., 2014). Acredita-se que este procedimento seja conhecido e utilizado há mais de 2000 anos, tendo tido origem na Ásia e no Extremo Oriente, onde se usavam vegetais locais, como repolho, nabo, rabanete, cenoura, entre outros (Hutkins, 2006). Durante a construção da Grande Muralha da China, por volta do séc. VII, a dieta dos chineses era fundamentalmente couve ácida fermentada, o chouxroute, acompanhada de uma bebida de arroz, o *rice wine* (Wacher, Díaz-Ruiz & Tamang, 2010).

No séc. XVI, a fermentação de fruta e vegetais chegou ao conhecimento dos Europeus, e, por altura dos Descobrimentos, o chouxroute e outros produtos fermentados serviam como alimento base dos marinheiros, em substituição das frutas e vegetais frescos, fornecendo minerais e vitaminas, nomeadamente vitamina C, muito importante na prevenção do escorbuto. O processamento de alimentos fermentados chegou ao Novo Mundo, por via dos Descobrimentos, pelos Europeus (Hutkins, 2006). Em 1730, emigrantes alemães e suecos, mais precisamente, amish e menonitas, estabeleceram-se no condado de Lancaster, na Pensilvânia, tendo levado consigo barris de chouxroute (Wacher et al., 2010). Por isso, estes emigrantes passaram a ser conhecidos como “Sauerkraut Yankees” ou “Krauts”. No outono, colhiam as couves e produziam o chouxroute, que comiam durante o inverno e a primavera seguintes. Em 1941, na altura da 2ª Guerra Mundial, o chouxroute foi temporariamente designado de “liberty cabbage” (Katz, 2003).

Hoje em dia, a couve fermentada ácida é muito consumida nos países da Europa, Áustria, França, Alemanha, Croácia, Grécia, Albânia, Bósnia e Herzegovina, Bulgária, República da Macedónia, Montenegro, Sérvia, Kosovo, Romênia, Rússia, fração europeia da Turquia, em alguns países asiáticos, China, Japão e Coreia e nos Estados Unidos (Wacher et al., 2010).

A técnica de fermentação de couve branca/repolho e o chouxcroute obtido apresenta diferenças consoante o local onde é produzido. Na região da Bósnia e Herzegovina a couve é fermentada inteira em grandes barris, tornando o processo muito mais lento. Os Russos adicionam maçãs durante a fermentação para adocicar e acelerar o processamento de chouxcroute e na Coreia do Sul o repolho é misturado com especiarias, pimentos, rabanetes e alhos, entre outros vegetais antes da fermentação, obtendo-se um produto final muito mais condimentado, designado kimchi (Katz, 2003; Hutkins, 2006; Wacher et al., 2010).

1.3.2 Caracterização de Chouxcroute

O chouxcroute é um alimento fermentado no qual apenas são utilizados dois ingredientes, couve e sal. De entre as variadíssimas couves que existem, a que normalmente se usa na produção de chouxcroute é o repolho ou couve branca (*Brassica oleracea* L.), de leve sabor doce, devido à presença de aproximadamente 5% de açúcares fermentescíveis, glucose e frutose em concentrações semelhantes e, em menores concentrações, sacarose (Hutkins, 2006).

A couve branca (*Brassica oleracea* L. var. capitata) é oriunda da região Mediterrânica e sudoeste da Europa, mas hoje em dia é plantada e consumida em todo o mundo devido à preferência dos consumidores (Šamec, Piljac-Žegarac, Bogović, Habjanič & Grúz, 2011). Este vegetal é uma excelente fonte de fibra, vitaminas e minerais e tem sido alvo de intensa investigação sobre os potenciais efeitos benéficos na saúde (Björkman et al., 2011). Com efeito, vários estudos referem que certas variedades de *B. oleracea* possuem compostos que têm propriedades cardio-protetoras (Beecher, 1994), anti-cancerígenas (Fowke, Longeope & Hebert, 2000; Fowke, Chung, Jin, Qi, Cai, Conaway, et al., 2003), elevadas atividades antioxidantes e antimicrobianas (Roy, Takenaka, Isobe & Tsushida, 2007; Ayaz, Hayirhoglu-Ayaz, Alpay-Karaoglu, Grúz, Valentová, Ulrichova, et al., 2008; Jaiswal, Raiauria, Abu-Ghannam & Gupta, 2011) e potencial para prevenir a obesidade (Williams, Edwards, Hammernig, Jian, James, Johnson et al., 2013). Este vegetal é rico em compostos polifenólicos, tais como ácidos fenólicos (Kusznierewicz et al., 2008), carotenoides (Nilsson, Olsson, Engqvist, Ekvall, Olsson, Nyman, et al., 2006), glucosinolatos (Song & Thornalley, 2007), flavonoides, antocianidinas e aminoácidos (Mattila & Hellstrom, 2007; Park, Arasu, Lee, Chun, Seo, Al-Dhabi et al., 2014a, b) e pertence ao grupo de vegetais com elevados teores de vitamina C (Gould, Tkesslee & King, 2006). Os ácidos fenólicos atuam como agentes antimicrobianos, possuem propriedades antivirais, anti-inflamatórias e anti-vasodilatadoras (Duthie, Duthie & Kyle, 2000) e são considerados importantes no tratamento preventivo do cancro e de doenças cardiovasculares (Ness & Powles, 1997, Luthria & Mukhopadhyay, 2006). Os flavonoides apresentam propriedades antivirais, anti-inflamatórias, antioxidantes e anti-histamínicas (Rice-Evans & Packer, 2003). O seu consumo regular está associado à redução do risco de doenças coronárias, pela prevenção da oxidação de

lipoproteínas de baixa densidade (Hung, Joshipura, Jiang, Hu, Hunter, Smith-Warner, et al., 2004). As propriedades antioxidantes das antocianinas têm um efeito considerável no controle da diabetes (Ghosh & Konishi, 2007).

De acordo com as tabelas de composição nutricional do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA, 2018) e a National Nutrient Database for Standard References (USDA, 2017) a composição nutricional da couve branca é 91,8-92,47 g de água, 1,28-1,4 g de proteína, 0,1-0,4 g de lípidos, 0,15-0,5 g de cinzas, 2,4-2,5 g de fibras, 3,5-5,8 g de hidratos de carbono, 7-18 mg de sódio, 170-240 mg de potássio, 40-50 mg de cálcio, 26-38 mg de fósforo, 6-12 mg de magnésio, 0,6 mg de ferro, 0,01 mg de riboflavina e 36,6-40 mg de vitamina C.

Após fermentação em salmoura a couve ácida apresenta características nutricionais e sensoriais diferentes da couve fresca. Em média, 100 g de chouxroute contém 92,52 g de água, 0,91 g de proteína, 0,14 g de lípidos, 2,15 g de cinzas, 2,9 g de fibras, 4,28 g de hidratos de carbono, 661 mg de sódio, 170 mg de potássio, 30 mg de cálcio, 20 mg de fósforo, 13 mg de magnésio, 1,47 mg de ferro, 0,022 mg de riboflavina e 52 – 86,7 mg de vitamina C (USDA, 2017).

Além do seu sabor ácido característico, devido à produção de ácido láctico (>1,5%) e de ácido acético (0,3%) durante a fermentação da couve, o chouxroute tem um sabor salgado, pela incorporação do sal adicionado, um ligeiro travo a etanol (0,5%), e pode ainda conter pequenas quantidades de diacetilo, acetaldeído e outros compostos voláteis, que lhe conferem um flavor particular. Também se pode encontrar no produto final manitol, que é produzido em baixas concentrações a partir da frutose durante a fermentação. Ao longo da fermentação, nomeadamente durante a fase inicial, existe uma acumulação de dióxido de carbono que vai carbonatar o chouxroute e aumentar a sensação bucal (Hutkins, 2006).

Os compostos glucosinolatos presentes na couve fresca são hidrolisados em produtos biologicamente ativos durante a fermentação (Dinkova-Kostova & Kostov, 2012), tais como o ascorbigeno (Peñas, Frias, Sidro & Vidal-Valverde, 2010a), o 4-metilsulfinil-butano-1-isotiocianato, o 1-propeno-3-isotiocianato, o 3-butenonitrilo, o 3-metilsulfinilo-propano-1-isotiocianato e o 4-metilsulfinil-butano nitrilo (Peñas, Pihlava, Vidal-Valverde & Frias, 2012a). Todos estes compostos têm evidenciado propriedades anticancerígenas (Jahgangir, Kim, Choi & Verpoorte, 2009).

1.3.3 Processamento de Chouxroute

No processamento de chouxroute consideram-se duas fases, a preparação e a fermentação.

A preparação do chouxroute é uma fase crucial, pois a proporção de couve e sal, a forma como a couve é cortada, a mistura e distribuição do sal na couve e a temperatura de acondicionamento para a fermentação afetam as características do produto final (Hutkins, 2006). Deve escolher-se um repolho que se encontre maduro, de forma a que contenha pelo menos 5% de açúcares fermentescíveis. As folhas exteriores e as estragadas devem ser removidas e o repolho deve ser lavado para reduzir a carga microbiana inicial e favorecer o desenvolvimento de BAL (Swain et al.,

2014). Em seguida, as folhas são finamente cortadas, pesadas e transferidas para recipientes onde decorrerá a fermentação. Depois procede-se à salga a concentrações de 2 a 3% (m/m) de sal (Hutkins, 2006). A salga tem como objetivo inibir enterobactérias e outras bactérias prejudiciais, promover a multiplicação das BAL e inibir o potencial pectinolítico e proteolítico excessivo de certas enzimas que podem amolecer a couve ou que até podem contribuir para a sua putrefação (Swain et al., 2014). O sal deve ser misturado uniformemente com a couve, para garantir uma boa homogeneização do produto a fermentar. Nesta fase, podem ser adicionadas especiarias como cominhos, pimenta em grão e bagas de zimbro (Hutkins, 2006; Wacher et al., 2010). Após a mistura, a água existente nas células da couve sai para o meio extracelular, por osmose, formando a salmoura. Este líquido não só contém sal e água como também açúcares que foram lixiviados da couve e que serão utilizados pela microbiota durante a fermentação. A concentração da salmoura condiciona o crescimento de microrganismos, favorecendo a presença e o crescimento de BAL. O sal e o ácido láctico produzido durante a fermentação, contribuirão para a preservação do produto final, para a textura crocante do choucroute e para o seu sabor salgado característico (Hutkins, 2006). Tradicionalmente a fermentação de choucroute era realizada em barris de madeira, mas hoje em dia, industrialmente, são utilizadas cubas de pedra revestidas com fibra de vidro ou plástico, com uma capacidade de armazenamento até 50.000 kg. Nestas cubas, o repolho é coberto por uma tampa pesada, ou por um plástico, que pressionado, permite que a couve se mantenha submersa na salmoura, promovendo a formação de mais salmoura, facilita a expulsão do ar e evita a exposição a insetos e outros organismos presentes no ar e substâncias estranhas ao produto. A fermentação decorre geralmente a temperaturas acima de 15 °C mas inferiores a 25 °C, durante aproximadamente um mês (Hutkins, 2006; Wacher et al., 2010). O diagrama da Figura 1 ilustra o fluxograma de processamento de choucroute.

A fase de fermentação começa assim que a salmoura se forma. Inicialmente o processo é aeróbio, mas devido à exclusão do ar, ao consumo do oxigénio residual resultante da respiração da microbiota existente na couve, o ambiente torna-se anaeróbio e os microrganismos aeróbios estritos, como as pseudomonas e alguns fungos, que inicialmente se encontram em maioria, perdem a capacidade de crescer, assim como os microrganismos sensíveis ao sal. Pode ainda observar-se o crescimento de microrganismos mesófilos aeróbios facultativos que são tolerantes a elevadas concentrações de sal, incluindo as bactérias dos géneros *Enterobacter* e *Erwinia* e outros coliformes. Porém, devido à competição pelos nutrientes e à produção de ácido láctico, estes microrganismos apenas sobrevivem durante os primeiros dias de fermentação (Hutkins, 2006).

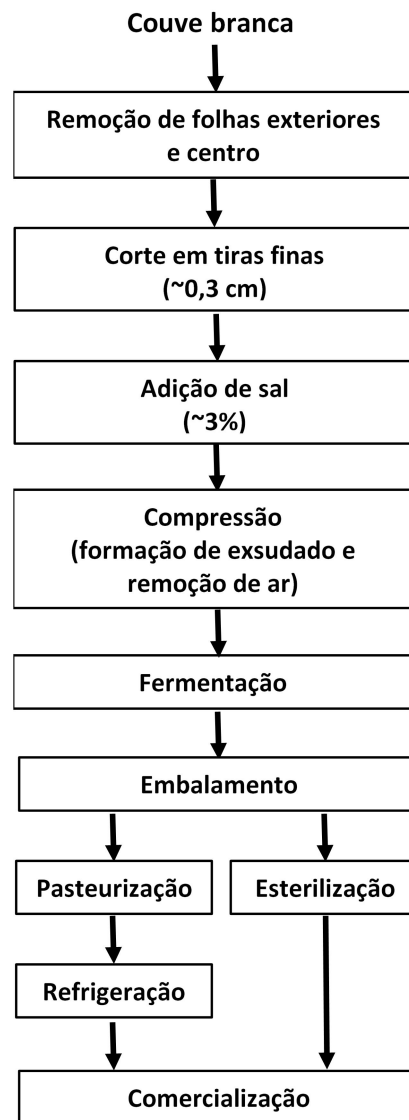


Figura 1.1 Processamento de chouxcroute.

A fermentação natural de chouxcroute (sem utilizar culturas de arranque ou culturas starter) deve-se fundamentalmente a uma sucessão de espécies de microrganismos que fazem parte da microbiota epifítica das matérias-primas utilizadas, em que as BAL, população minoritária no início, desempenha um papel muito importante. Durante as primeiras horas (cerca de 24 h) devido à existência de oxigénio observa-se o crescimento de várias espécies de microrganismos (Gram +, Gram – e fungos). O consumo do oxigénio contribui para o decréscimo da população aeróbia e para a multiplicação da população microaerofílica e anaeróbia facultativa, incluindo as bactérias ácido-láticas que existem em números muito reduzidos nas matérias-primas. Uma das espécies que mais tem sido referida como responsável pelo início da fermentação ácido-láctica nas couves ácidas é *Leuconostoc mesenteroides* (Nout & Rombouts, 2000; Hutkins, 2006; Adams, Moss & McClure, 2016). *L. mesenteroides* é uma bactéria tolerante a elevadas concentrações de sal, que cresce rapidamente a temperaturas de 15 a 18 °C e que tem a capacidade de metabolizar os açúcares por via heterofermentativa. Esta bactéria contribui para o início da fermentação da couve, e é uma das

principais responsáveis pela produção de ácido láctico e ácido acético, dióxido de carbono, manitol, dextrano e etanol. A acidificação do meio nesta altura (0,6 a 0,8% de ácido láctico) vai, não só, inibir o crescimento de bactérias não-lácticas, como também promover o crescimento de outras espécies de BAL. Além disso, a produção de dióxido de carbono vai contribuir para a anaerobiose facilitando também o crescimento das BAL. Porém, à medida que o meio se vai tornando mais ácido (1% de ácido láctico), *L. mesenteroides* começa a perder a capacidade de se reproduzir e ao fim de 4 a 6 dias já não se deteta a sua presença nalgumas fermentações (Hutkins, 2006). Assim, no decurso do processo fermentativo surgem *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus curvatus* (Nout & Rombouts, 2000). *L. plantarum*, é uma bactéria heterofermentativa facultativa, que consegue metabolizar diferentes açúcares através das vias hetero e homofermentativa. *L. brevis*, *L. sake*, e *L. curvatus* são bactérias heterofermentativas (Johanningsmeier, McFeeters, Fleming & Thompson, 2007; Terán, Coeuret, Raya, Zagorec, Champomier-Vergès & Chailou, 2018). Estas espécies continuam a produzir ácido láctico, aumentando a sua concentração para o dobro (1,4 a 1,6%). Quando a acidez do meio se aproxima de 1,6% e o pH desce, atingindo valores inferiores a 4, algumas destas bactérias são inibidas.

Vários trabalhos revelaram a presença de outras espécies, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus coryniformis*, *Weissella* sp. e *Pediococcus* spp. (Plengvidhya, Breidt, Lu & Fleming, 2007) ao longo da fermentação. Wolkers-Rooijackers et al. (2013) identificaram *L. mesenteroides* e *Lactococcus lactis* durante todo o período fermentativo, para além de *Kluyvera ascorbata*, *L. curvatus* e *L. coryniformis*. Neste estudo estes autores não detetaram *L. brevis*, *L. sake*, *L. bavaricus* e *Pediococcus* spp..

As diferenças de resultados obtidos pelos diversos autores no que diz respeito à população de BAL, podem explicar-se pelas diferenças na microbiota inicial das matérias-primas, pelas condições de fermentação (temperatura e concentração de sal) e pelas metodologias de identificação bacteriana utilizadas. Enquanto que os trabalhos mais antigos foram realizados utilizando métodos que se baseiam na inoculação das amostras em meios de cultura adequados, mais recentemente tem sido possível estudar a microbiota dos alimentos recorrendo a técnicas independentes do cultivo em meios nutritivos (Zabat, Sano, Wurster, Cabral & Belenky, 2018).

Tendo em conta a bibliografia, alguns autores consideram no processo fermentativo de chouxcroute duas fases: a fase inicial, ou heteroláctica e a fase homoláctica (Hutkins, 2006; Johanningsmeier, et al., 2007), contudo esta abordagem não tem sido referida nas referências bibliográficas mais recentes.

De acordo com Hutkins (2006) e Swain et al. (2014) a fermentação considera-se finalizada quando a acidez atinge 1,7% e os valores de pH variam entre 3,4 e 3,6.

Após a fermentação, o chouxcroute é embalado em recipientes de vidro ou plástico ou enlatado sendo submetido a processos de esterilização, ou pasteurização seguidas de refrigeração. Estes tratamentos térmicos diminuem a probabilidade de ocorrência de crescimento microbiano indesejado e aumentam o tempo de vida útil do produto final obtido. Em alguns casos, são adicionados conservantes, como benzoatos e sulfitos, com atividade antifúngica. Os produtos pasteurizados são

obrigatoriamente mantidos a temperaturas de refrigeração. Se a temperatura de armazenamento do chouxcroute pasteurizado não for suficientemente baixa ($>4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $<10\text{ }^{\circ}\text{C}$), ou se a concentração de sal for muito baixa ($\leq 2\%$), poderá haver crescimento de bactérias Gram negativas, como *Enterobacter*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas*, assim como a produção, por algumas destas bactérias, de enzimas pectinolíticas, que vão hidrolisar as pectinas da couve e provocar um amolecimento indesejado (defeito) no produto fermentado obtido. O chouxcroute pode ainda apresentar outros defeitos, como uma textura pegajosa ou filamentosa resultante da produção de dextranos e de outros polissacarídeos, por *L. mesenteroides*, ou pela produção de compostos da capsula de diversas bactérias (Hutkins, 2006).

1.4 Consumo de Sal e Saúde

A nível mundial, o consumo de sal excede largamente o valor de 5 g/dia/pessoa e em Portugal ultrapassa os 10 g/dia/pessoa (Graça, 2013). Neste sentido, a OMS definiu recomendações e estratégias a implementar para se reduzir o consumo de sal da população em 30% até 2025. Esta medida parece ser uma das formas mais económicas de melhorar a saúde da população e irá repercutir-se num ano extra de vida saudável, a baixos custos, por pessoa. Se os valores de consumo de sal estipulados pela OMS forem cumpridos, estima-se que poderão ser prevenidas 2,5 milhões de mortes por ano (OMS, 2013).

As estratégias definidas e recomendadas pela OMS para redução da ingestão de sal foram divulgadas em 2013 e resumem-se nos seguintes princípios: (i) definir políticas governamentais e regulamentações fiscais adequadas, que garantam que os fabricantes de produtos alimentares produzam alimentos mais saudáveis ou que os retalhistas coloquem os produtos saudáveis de forma mais acessível; (ii) trabalhar com o setor privado para melhorar a disponibilidade e acessibilidade de produtos com pouco sal; (iii) sensibilizar a população através do marketing social e da mobilidade para a necessidade de reduzir o consumo de sal; (iv) monitorizar a ingestão de sal da população, através das fontes de sal usadas na dieta, conhecimentos do consumidor e atitudes e comportamentos relacionados com o consumo de sal; (v) integrar uma formação sobre redução de sal no currículo de manipuladores de alimentos; (vi) retirar das mesas de restaurantes o sal de mesa e os molhos de soja; (vii) adicionar aos rótulos dos produtos alimentares a quantidade de sódio que contém, ou indicar nos rótulos que “são ricos em sódio”; (viii) reduzir de forma lenta e contínua a quantidade de sal dos produtos alimentares processados, para que os consumidores tenham um tempo de habituação; (ix) promover a divulgação dos benefícios no consumo de alimentos com baixos teores de sal; e (x) reduzir a quantidade de sal usada na confeção dos pratos em restaurantes e empresas de catering (OMS, 2013).

Seguindo as recomendações da OMS é necessário proceder a alterações do processamento de alimentos com sal, reduzindo a sua quantidade, substituindo-o, em parte ou na totalidade, por outros ingredientes, que possam conferir sabor, textura e aroma agradáveis e característicos do produto inicial, sem se fazer notar a ausência ou redução da quantidade de sal e mantendo a qualidade, segurança e o tempo de vida útil dos alimentos.

1.5 Chouxcroute com Baixo Teor de Sal

A produção de chouxcroute tem sido alvo de vários estudos com o objetivo de se reduzir a quantidade de sal, sem se alterar consideravelmente as suas características. São exemplos a produção de chouxcroute com vinho, com especiarias, por exemplo alcaravia e sementes de endro e aipo, e, com algas marinhas (Katz, 2003). Outros exemplos existem, nomeadamente ensaios de fermentação de couve conduzidos em salmouras com menores teores de NaCl, simplesmente por redução da sua concentração na preparação inicial, ou por substituição parcial deste sal mineral com misturas de sais minerais, usando cloretos de sódio, potássio, cálcio e magnésio (Viander et al., 2003; Peñas et al., 2010b; Wolkers-Rooijackers et al., 2013; Gagné, Barrette, Savard & Brassard, 2015; Xiong, Li, Liang, Wang & Guan, 2016).

Viander et al. (2003) testaram a fermentação de couve utilizando salmouras de NaCl em concentrações de 0,5% (m/m) e 1,2% (m/m) e de uma mistura de sais de 0,5% (m/m) de concentração, dos quais 57% era cloreto de sódio, correspondendo a uma concentração final de 0,3% NaCl (m/m), 28% cloreto de potássio e 12% de sulfato de magnésio, e concluíram que pode ser produzido chouxcroute com um teor de NaCl muito baixo, assim como com uma baixa percentagem de sais minerais. Estes autores, mostraram também que a fermentação é mais rápida quando usavam 1,2% NaCl, provavelmente devido à capacidade do NaCl promover a exsudação de água e açúcares da couve e por conseguinte, aumentar o crescimento de BAL. A utilização da mistura de sais produziu um chouxcroute de sabor mais suave, menos ácido e da preferência dos provadores.

Wolkers-Rooijackers et al. (2013) referem a produção de chouxcroute utilizando três cenários: A - controlo com 15 g NaCl/kg, B – redução de 40% de NaCl com 9 g NaCl/kg, e, C - substituição de 40% de NaCl com 9 g NaCl/kg, 4,5 g KCl/kg, 0,75 g MgCl₂/kg e 0,75 g CaCl₂/kg. Os produtos obtidos apresentavam segurança microbiológica associada a baixos valores de pH (3,4-3,7), indicando a ocorrência de uma fermentação ácido-láctica adequada. A avaliação sensorial demonstrou que os processos A e C eram aceitáveis e equivalentes, enquanto que o B não correspondia aos critérios industriais de boa qualidade, porque o chouxcroute apresentava uma textura mais macia que os outros.

Peñas et al. (2010b) realizaram um estudo de fermentação de *B. oleracea* com 0,5% e 1,5% de NaCl (m/m), utilizando *L. plantarum* ou *L. mesenteroides*, como culturas starter e referem que a fermentação de couve branca, com *L. mesenteroides* e 0,5% NaCl, produz chouxcroute com excelente qualidade em termos de segurança alimentar, apresentando os mais baixos teores de aminas biogénicas.

Gagné et al. (2015) referem que apesar da redução do teor em sódio ter um impacto positivo significativo no processo de fermentação do chouxcroute, não tem influencia na destruição das partículas de norovírus ou na sua sobrevivência.

Xiong et al. (2016) estudaram o impacto de diferentes concentrações de sal (2%, 5% e 8%, m/v) no perfil de fermentação de chouxcroute e verificaram que a concentração de sal afeta principalmente a

fase inicial da fermentação. O ensaio realizado a 2% de sal acelerou a maturação do chouxcroute e não foi eficaz na inibição do crescimento de microrganismos indesejáveis. Por outro lado, a 5% de sal a população de fungos e *E. coli* desapareceram rapidamente. A 8% de sal houve um atraso na maturação do chouxcroute, uma minimização na utilização de sacarose e uma redução do metabolismo das BAL. Em suma, de acordo com estes autores, a concentração de 5% de sal melhora a qualidade do chouxcroute obtido. Contudo, 5% de sal corresponde a uma concentração superior ao que normalmente se utiliza.

A reformulação de alimentos pela redução do teor de NaCl requer estudos detalhados antes da sua implementação a nível industrial, e qualquer alteração no seu processamento deve garantir que o alimento obtido seja microbiologicamente seguro durante o prazo de validade expectável (Mateus, Santo, Saúde, Pires-Cabral & Quintas, 2018).

1.5.1 *Salicornia ramosissima* L.

As halófitas são plantas que têm a capacidade de se desenvolver em condições extremas, existentes em ambientes secos, extremamente quentes ou frios, com elevada exposição solar e elevadas concentrações de sal (Lopes, Rodrigues, Pereira, Oliveira, Barreira, Varela et al., 2016). Têm um metabolismo que lhes permite reter nos seus caules uma elevada concentração de sais minerais (Isca, 2013), sendo os principais, sais de sódio, de potássio, de magnésio, de cálcio e de ferro (Barreira et al., 2017). Crescem nas costas litorais, nos sapais e nos pântanos e podem encontrar-se na costa litoral da Península Ibérica, nos países a oeste da Europa, nos países Mediterrânicos, no noroeste de África e na Ásia central (Isca, 2013; Isca, Seca, Pinto, Silva & Silva, 2014).

A espécie *Salicornia ramosissima* é uma planta halófito, não obrigatória, que pertence à família *Chenopodaceae* e à ordem *Caryophyllales* (Woods, 1851). É caracterizada por ser uma planta anual (planta que germina, floresce e morre no período de um ano), atinge em média uma altura de 40 cm, tem caules carnudos e suculentos e uma folhagem vestigial ou mesmo inexistente. Durante a primavera, apresenta cor verde, mas no outono os seus caules mudam de cor para vermelho-púrpura, razão pela qual é conhecida em Inglaterra por “*purple glasswort*”. Em Portugal e em Espanha é chamada de “sal verde”, “erva salgada” ou “espargos-do-mar” (Isca, 2013), sendo muito utilizada na cozinha como um produto gourmet, em saladas e temperos, fresca ou desidratada e moída em substituição do sal, ou cozida ou salteada e utilizada como acompanhamento de peixe ou ovos, ou como ingrediente de quiches (Isca et al., 2014).

Muito antes de ser considerada como alimento, a salicórnia foi usada na altura dos Descobrimentos, com um fim medicinal contra o escorbuto, devido à elevada concentração em vitamina C. No séc XVIII, foi importante para o fabrico de vidro, sabão e soda. Só em 1920 é que a salicórnia começou a ser comercializada como um legume barato, e, durante a 2ª Guerra Mundial era vendida conservada em gelo (Julião, 2013).

Vários autores referem que algumas das espécies de salicórnia têm efeitos terapêuticos, principalmente no tratamento de obesidade, nefropatia e cancro, além disso demonstram

experimentalmente que esta planta também apresenta atividade biológica (Isca et al., 2014; Ferreira, Isca, Leal, Seca, Silva, Pereira et al., 2016;). Estudos recentes referem a presença compostos derivados de t-butilfenol, alguns compostos alifáticos, alguns flavonóides e atividade antioxidante e fotoprotetora contra a radiação UV, devido à presença de compostos fenólicos (Isca, 2013; Isca et al., 2014; Ferreira et al., 2016; Lopes et al., 2016).

A espécie *S. ramosissima* L., tal como as outras halófitas, apresenta um teor elevado de água (84,5%). É rica em fibra e cinzas e tem baixos teores de proteína e lípidos, sendo a sua composição nutricional em peso seco de, 22,5%, 29,2%, 5,2% e 1,87%, respetivamente (Barreira et al., 2017).

Relativamente ao teor em fibra, o consumo de 100 g de *S. ramosissima* L. fresca cobre 50% da dose diária recomendada de fibra, sendo que o consumo de 7 g de fibra de origem vegetal ou cereal é o suficiente para diminuir significativamente o risco de doenças coronárias e cardiovasculares (Threapleton, Greenwood, Evans, Cleghorn, Nykjaer & Woodhead, 2013; Barreira et al., 2017).

A grande concentração de cinzas das halófitas deve-se ao facto de crescerem em ambientes salinos e à elevada capacidade de acumulação de sais minerais de Na, K, Ca, Mg e Fe, o que, do ponto de vista nutricional, torna estas plantas fontes valiosas de minerais essenciais. O sódio é o mineral que se encontra em maior concentração, sendo que em 100 g de *S. ramosissima* fresca existem 1393 mg de Na. Os restantes minerais encontram-se em menores concentrações, 8,92 mg de K, 4,86 mg de Ca, 9,43 mg de Mg e 1,53 mg de Fe por g de peso seco (Aberoumand & Deokule, 2009). As plantas halófitas, da espécie *S. ramosissima* L., possuem uma elevada concentração de manganês, 204 µg/g de peso seco. Estima-se que o consumo de 60 g de *S. ramosissima* fresca cubra as necessidades diárias recomendadas pela OMS de 2 mg de Mn, sem exceder o limite máximo recomendado de sódio. Além disso, quando crescem em ambientes poluídos acumulam metais pesados, como chumbo, zinco, crómio, níquel e cádmio (Caetano, Vale, Cesário & Fonseca, 2008), que se encontram em maiores concentrações nas raízes. Contudo, de acordo com Barreira et al. (2017) os níveis destes metais tóxicos estão abaixo dos valores legislados.

As plantas halófitas apresentam no seu perfil lipídico mais de 50% de ácidos gordos saturados, os quais têm sido relacionados com os mecanismos de tolerância ao sal (Barreira et al., 2017).

Em relação ao perfil lipídico, as sementes destas plantas halófitas contêm 28-30% de óleo vegetal, o qual é composto por ácidos gordos insaturados, mais especificamente por ácido α -linoleico e linolénico (Desai, Dave & Devi, 2006; Isca et al., 2014). Apresentam índices de trombogenicidade (IT) e de arterogenicidade (IA) muito parecidos aos do atum, que é um peixe conhecido como um bom aporte de ácidos gordos insaturados. O índice de trombogenicidade (IT) dá indicação da tendência para se formarem trombos, e é definido pela razão entre o ácido-gordo saturado pro-trombogénico e o ácido-gordo anti-trombogénico (monoinsaturado, ω -3 e polinsaturado, ω -6). O índice de arterogenicidade (IA) é a razão entre os principais ácidos-gordos saturados pró-arterogénicos e os principais ácidos-gordos insaturados anti-arterogénicos. É desejável que ambos os índices apresentem valores baixos. As plantas halófitas têm baixos índices IT e IA, que se devem à elevada concentração de ácido-gordo α -linoleico (ALA). O consumo deste ácido-gordo apresenta vários

benefícios para a saúde, pois é um precursor dos ácidos eicosapentanoico (EPA) e docosapentanoico (DPA), pode reduzir os níveis do ácido araquidónico e de triglicéridos, tem propriedades anti-inflamatórias, que podem prevenir doenças coronárias e apresenta efeitos positivos na recuperação de danos no sistema nervoso central (Barceló-Coblijn & Murphy, 2009).

Isca et al. (2014) realizaram análises ao perfil lipofílico da espécie *S. ramosissima* L., tendo identificado e quantificado, por GC-MS, 57 compostos, dos quais os principais são ácidos carboxílicos, álcoois de cadeia longa, esteróis e alcanos. Destes, os mais abundantes são os álcoois de cadeia longa, (45,32%, com o tetracosanol em maior concentração, 11,89%) e os ácidos-gordos saturados (31,27% com o ácido palmítico em maior concentração, 12,08%).

De entre os álcoois de cadeia longa, os alceno-1-ols são os mais abundantes no perfil lipofílico de *S. ramosissima*, representando 78,2%. Também foram encontrados alceno-2-ols, mas em menores concentrações. Estes compostos têm propriedades antiangiogénicas, atuando como mediadores nos processos inflamatórios, participam no metabolismo do colesterol e impedem a peroxidação dos lípidos (Isca et al., 2014).

Dos ácidos carboxílicos, 9,2% corresponde a ácidos-gordos insaturados, 4,9% a ácidos-gordos polinsaturados, dos quais o ácido linoleico (ω -6) é o mais abundante, e 2,5% corresponde aos ácidos-gordos trans, palmitelaídico e octadec-11-enoico, ácidos-gordos que participam na inibição da acetilcolinaesterase, nos processos imunomodulatórios e na redução da concentração sérica de colesterol-LDL. De entre as espécies de salicórnia, *S. ramosissima* L. é a que tem menor concentração em ácidos-gordos insaturados (Guil, Torija, Giménez & Rodriguez, 1996; Radwan, Nazif & Abou-Setta, 2007; Lu, Zhang, Wang, Zhou & Zhu, 2010; Isca et al., 2014). Além disso, esta espécie de salicórnia possui uma razão entre os ácidos-gordos polinsaturados ω -6 e ω -3 baixa (2,35), sendo que a razão abaixo de 5 está associada à diminuição do risco de desenvolvimento e/ou agravamento de doenças cardiovasculares, cancro, doenças inflamatórias e autoimunes (Simopoulos, 2008; Isca et al., 2014).

Os esteróis são os terceiros ácidos-gordos mais abundantes no perfil lipofílico de *S. ramosissima* L., sendo o stigmasterol e o β -sitosterol os de maior concentração (Isca et al., 2014).

1.6 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o processamento de couve da espécie *Brassica oleracea* var. capitata por fermentação ácido-láctica, utilizando como substituto total ou parcial do cloreto de sódio, a planta halófita salicórnia da espécie *Salicornia ramosissima* L.. Os objetivos específicos do trabalho foram os seguintes:

- Estudar a variação dos parâmetros físico-químicos (pH, acidez e cor) ao longo dos processos fermentativos da couve.

- Estudar a variação da microbiota (microrganismos mesófilos aeróbios, bactérias ácido-láticas (BAL), fungos filamentosos e leveduras e coliformes totais) ao longo dos processos fermentativos da couve.
- Pesquisar os parâmetros microbiológicos de segurança alimentar (*Salmonella* sp. e *Staphylococcus* coagulase positivos) e enumerar o parâmetro de higiene alimentar (*Escherichia coli*) nos produtos finais obtidos.
- Caracterizar organoleticamente os produtos finais obtidos.
- Caracterizar nutricionalmente a couve ácida produzida que obteve a melhor avaliação sensorial.
- Estudar o efeito da adição do CaCl_2 no perfil de fermentação da couve e nas características do produto final obtido.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

A couve branca (*Brassica oleracea* L., var. capitata) e o sal de mesa foram adquiridos num supermercado local de Portimão, na região do Algarve em Portugal.

A salicórnia (*Salicornia ramosissima* L.) foi gentilmente fornecida pela empresa Riafresh, Verduras da Ria Formosa, Agro-On, Lda, sediada no Centro Empresarial Gambelas. Pav. F-16. Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139, Faro, Portugal

Os reagentes utilizados nas análises físico-químicas e nutricionais de grau de pureza *pro analysi* foram obtidos de várias fontes comerciais. Os meios de cultura foram também adquiridos de várias fontes comerciais.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação da Couve a Fermentar

O trabalho experimental de fermentação de *B. oleracea* L., utilizando *S. ramosissima* L., foi realizado nos Laboratórios de Microbiologia, Química e Processamento do Instituto Superior de Engenharia, da Universidade do Algarve.

Após a higienização do espaço de bancada, tábuas de corte e instrumentos, procedeu-se à preparação da couve branca, removendo as folhas exteriores e a parte interior rígida. Seguidamente, as folhas foram finamente cortadas num processador de alimentos doméstico, pesadas e introduzidas em sacos de polietileno de 80 µm de espessura e 1,67 g/m²d de permeabilidade.

Consoante o ensaio experimental e de acordo com o delineamento realizado, foram adicionados sal de mesa e/ou salicórnia previamente selecionada e cortada em pequenos fragmentos (0,5 cm). Foram também realizados ensaios de fermentação com sal de mesa, salicórnia e CaCl₂. Os ingredientes foram distribuídos uniformemente na couve e a mistura foi ligeiramente pressionada/macerada.

Os sacos foram fechados com vácuo ligeiro (2 em 10) e selagem média (3 em 10), utilizando uma máquina de selagem e embalagem com atmosfera modificada (Quick Pack), e, foram armazenados numa estufa (Binder) à temperatura constante de 20 °C, durante 20 dias.

2.2.2 Delineamento Experimental

Foram realizadas 16 fermentações independentes, utilizando as matérias-primas nas quantidades indicadas na Tabela 2.1: Os ensaios controlo, A (ou A'), usando a concentração tradicional de sal mesa (~3%), com elevado teor de sódio (~1,2% Na); os ensaios com salicórnia, B, com metade da % sal equivalente (~1,6%), correspondendo a baixo teor de sódio (~0,3% Na); os ensaios com sal e salicórnia, C (ou C'), com aproximadamente 2% sal equivalente, correspondendo a um teor de sódio intermédio (~0,5% Na); e, os ensaios com sal, salicórnia e CaCl₂, D, com igual teor de sódio (~0,5%

Na) e cerca de 3% sal equivalente. As % sal equivalente foram calculadas tendo em conta a contribuição dos minerais Na, Ca e K.

Tabela 2.1 Codificação das experiências/fermentações, ingredientes, % sal equivalente e Na total.

Experiência/fermentações	Código	Couve (g)	Sal (g)	Salicórnia (g)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g)	NaCl-equiv total (%)	Na total (%)
Experiência com sal (Controlo)	A ou A'	80	2,4	-	-	2,91	1,15
Experiência com salicórnia	B	80	-	24	-	1,56	0,34
Experiência com sal e salicórnia	C ou C'	80	0,4	24	-	1,94	0,49
Experiência com sal, salicórnia e CaCl ₂ .2H ₂ O	D	80	0,4	24	1,28	2,89	0,48

2.2.3 Momentos de Amostragem

Ao longo da fermentação foram realizados 8 a 12 momentos de amostragem e em cada momento foram abertos dois novos sacos de cada ensaio de fermentação, para a realização das análises físico-químicas e microbiológicas (Tabela 2.2). Após 20 dias de fermentação, consoante os resultados das análises microbiológicas, procedeu-se a análise sensorial da couve fermentada, usando dois novos sacos de cada ensaio. Foram igualmente realizadas análises à composição nutricional da couve ácida obtida, que melhor correspondia à preferência dos provadores, assim como das matérias-primas utilizadas, couve branca e salicórnia.

Tabela 2.2 Calendarização das análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.

		Tempo (dia)											
Amostragens		0	2	4	6	7	8	9	13	14	15	16	20
Análises	Físico-Químicas	pH	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		Acidez	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		Cor	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		Textura	✓										✓
		a_W	✓										✓
		Salinidade	✓										✓
		SST	✓										✓
		Comp. Fenólicos											✓
		Ativ Antioxidante											✓
		Análises Microbiológicas		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Análises Sensoriais													✓

✓ - análise realizada, *a_w* - Atividade da água, SST- Sólidos solúveis totais, Ativ Antioxidante – Atividade Antioxidante, Comp. Fenólicos – Compostos Fenólicos

2.2.4 Análises Físico-químicas

2.2.4.1 pH

Recolheu-se aproximadamente 10 ml de exsudado de cada amostra e realizou-se a medição direta do pH, utilizando um potenciómetro (Crison, pH meter GLP 21), com uma sonda para líquidos. O ensaio foi realizado em triplicado.

2.2.4.2 Acidez

A acidez, expressa em g ácido láctico/100 ml de exsudado (% m/v), foi determinada por titulação de 10 ml de exsudado, aos quais se adicionou previamente 50 ml de água destilada e 8 gotas de solução de fenolftaleína, usando uma solução 0,1 N de NaOH. Para cada amostra fez-se a análise em triplicado.

2.2.4.3 Atividade da água (a_w)

A atividade da água de amostras dos preparados, couve com sal, couve com salicórnia e couve com sal e salicórnia, couve com sal, salicórnia e CaCl_2 , e dos respectivos produtos fermentados (ensaios A, B, C e D, respetivamente) foi medida, em triplicado, a 25 °C, num sensor de humidade de cloreto de lítio (Rotronic DT Hygroskop, DMS-100H).

2.2.4.4 Salinidade

A salinidade do exsudado dos preparados, couve com sal, couve com salicórnia e couve com sal e salicórnia, couve com sal, salicórnia e CaCl_2 , e dos respectivos produtos fermentados (ensaios A, B, C e D, respetivamente) foi medida num refratómetro HI 96821. O ensaio foi realizado em triplicado.

2.2.4.5 Sólidos Solúveis Totais (SST)

Os sólidos solúveis totais do exsudado dos preparados A, B, C e D e dos respectivos produtos fermentados foram obtidos por medição do índice de refração, utilizando um refratómetro HI 96801. Precedeu-se à leitura em triplicado à temperatura de 25 °C.

2.2.4.6 Cor

A análise da cor dos preparados, A, B, C e D e dos respectivos produtos fermentados foi realizada utilizando um colorímetro PCE Instruments spectrophotometer (PCE, CSM/0), de geometria d/8, com fonte de luz D_{65} e ângulo de observação 10°, através da leitura dos parâmetros L , a , b , c e h , que indicam respetivamente: a luminosidade L , que varia entre 0 (preto) e +100 (branco); a graduação dos tons verde (-100) a vermelho (+100) para a ; a graduação dos tons azul (-100) a amarelo (+100) para b ; a saturação ou vivacidade da cor, c ; e a tonalidade da cor, h . O colorímetro foi previamente calibrado com os padrões de referência branco ($X = 84,53$, $Y = 89,32$ e $Z = 94,36$) e preto ($X = 0,016$, $Y = 0,015$ e $Z = 0,014$). Foram realizadas 5 leituras para cada amostra de couve.

2.2.4.7 Textura

A textura dos preparados, A, B, C e D e dos respectivos produtos fermentados foi medida num texturómetro LFRA Texture Analyzer 1500, Brookfield, equipado com uma célula de carga de 1,5 kg e uma sonda de aço inoxidável TA 39 (2 mm diâmetro, 20 mm comprimento e superfície plana). De acordo com o método de Cruz, Godinho, Dilek, Necip & Vieira (2016), realizou-se um teste de deformação, colocando um fragmento de folha de couve entre duas placas metálicas, com um orifício cilíndrico no centro (15 mm de diâmetro) orientados sobre e sob a folha. A velocidade da sonda era

de 0,5 mm/s e a extensão de deformação de 10 mm. A força máxima e a área sob a curva respectiva foram usadas para quantificar a Dureza (N) e o Trabalho realizado na deformação da amostra (N.m), respectivamente. Estes atributos de textura foram obtidos através do software Texture ProLite V1.1. Foram realizadas 10 leituras para cada amostra.

2.2.4.8 Compostos Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante

Extração de Compostos Fenólicos Totais

Adicionou-se 15 ml de metanol a 100% a 5 g de amostra macerada, agitou-se a 150 rpm e ao abrigo da luz, durante 24 horas. Centrifugou-se numa centrífuga Sigma 3K20 a 1600 g, a 20 °C durante 15 minutos. Seguidamente, filtrou-se usando papel de filtro de filtração média/rápida, Ø 70 mm, para um balão de 25 ml e perpez-se com metanol 100%. O ensaio foi realizado em triplicado.

Análise de Compostos Fenólicos Totais

A concentração de compostos fenólicos totais foi determinada por espectrofotometria de acordo com Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventos (1999). A 0,1 ml de extrato adicionou-se 0,5 ml de reagente Folin-Ciocalteau (0,2 N), agitou-se e aguardou-se 2 minutos. Seguidamente, adicionou-se 0,4 ml de solução saturada de carbonato de sódio 7,5% (m/v) e 4 ml de água. Após 1 hora, ao abrigo da luz, leu-se a absorvância a 765 nm num espectrofotómetro Genesys™ 10 Series. A concentração em compostos fenólicos totais foi calculada com base numa curva de calibração de ácido gálico com as seguintes concentrações (0,015; 0,0325; 0,075; 0,125; 0,25; 0,50 mg/ml) e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/100 g de amostra.

Determinação da Atividade Antioxidante

A determinação da atividade antioxidante foi realizada segundo o método de Boskou, Salta, Chrysostomou, Mylona, Chiou & Andrikopoulos (2006), e traduz a capacidade para bloquear radicais livres de 2,2-difenil-1-picrihidrazilo, DPPH•. Alíquotas de soluções de extratos metanólicos (0,1 ml) contendo diferentes concentrações foram adicionadas a 3,9 ml de solução de DPPH• (6 x 10⁻⁵ M em metanol). A mistura foi agitada vigorosamente e deixada em repouso no escuro à temperatura ambiente. A absorvância foi lida a 517 nm. O efeito bloqueador dos radicais livres DPPH• foi calculado como a percentagem de descoloração de DPPH• (Eq. 1):

$$\% \text{ efeito bloqueador} = \frac{A_{DPPH} - A_S}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

onde, A_S é a absorvância da solução quando o extrato da amostra foi adicionado a uma concentração particular e A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH•. A concentração de extrato a que corresponde 50% de inibição do radical livre DPPH• (EC_{50}) é calculada a partir da representação gráfica da percentagem do efeito bloqueador em função da concentração do extrato. Foi preparada uma curva de calibração, usando soluções de Trolox de concentração 25–600 µM. A atividade antioxidante foi expressa em µmol Trolox/100 g amostra.

2.2.5 Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas em bancadas previamente desinfetadas munidas de bico de Bunsen, utilizando material estéril: colheres, pinças, bisturis, sacos de stomacker, placas de Petri, pontas de pipetas e espalhadores.

Os meios de cultura foram feitos com antecedência, esterilizados e armazenados em refrigeração, com exceção do meio de cultura Chromocult Coliform Agar (Merck), que foi preparado no dia da análise.

De forma a realizar as análises microbiológicas misturou-se 10 g do preparado de couve com sal, ou couve com salicórnia, ou couve com sal e salicórnia ou couve com sal, salicórnia e CaCl_2 , ou dos respectivos produtos fermentados (ensaios A, B, C e D, respetivamente), de cada amostra (de cada saco), com 90 ml de solução de “Ringer” (Merck) num saco de stomacker e homogeneizou-se durante 1 minuto. Posteriormente, procedeu-se à realização de diluições decimais sucessivas.

2.2.5.1 Contagem de Microrganismos Mesófilos Aeróbios

Inoculou-se 1 ml de cada diluição decimal (em duplicado), em cada placa, e incorporou-se no meio de cultura “Plate Count Agar” (PCA) (Scharlau), tendo-se incubado as placas numa estufa a 30 °C, durante 3 dias. As contagens das colónias foram realizadas após 48 e 72 horas (ISO 4833-1, 2013). Os resultados obtidos foram expressos em logaritmo de unidades formadoras de colónias por grama (Log UFC/g).

2.2.5.2 Contagem de Bactérias Ácido-Láticas (BAL)

Inoculou-se 1 ml de cada diluição decimal (em duplicado), em cada placa, e incorporou-se no meio de cultura “Man Rogosa and Sharpe Agar” (MRS) (Scharlau), suplementado com ácido sórbico (0,14%). Adicionou-se uma segunda camada de meio MRS. Após a solidificação desta camada, incubaram-se as placas numa estufa a 30 °C, durante 4 dias. As contagens das colónias foram realizadas ao 3º e ao 4º dia (ISO 15214, British Standard, 1998). Os resultados obtidos foram expressos em Log UFC/g.

2.2.5.3 Contagem de Fungos Filamentosos e Leveduras

Inoculou-se 0,1 ml de cada diluição decimal (em duplicado), na superfície do meio de cultura “Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol” (DRBC) (Scharlau) e procedeu-se ao espalhamento da amostra por toda a superfície do meio. Depois, incubaram-se as placas numa estufa a 25 °C, durante 5 dias. As contagens das colónias foram realizadas ao 3º e ao 5º dia (ISO 21527-2, 2008). Os resultados obtidos foram expressos em Log UFC/g.

2.2.5.4 Contagem de Coliformes Totais

Inoculou-se 1 ml de cada diluição decimal (em duplicado), em cada placa, e incorporou-se no meio de cultura “Chromocult Coliform Agar” (Merk), e incubaram-se as placas numa estufa a 37 °C, durante 24

horas. As contagens das colónias típicas foram realizadas após 24 h (González, Tamagnini, Olmos & Sousa, 2003). Os resultados obtidos foram expressos em Log UFC/g.

2.2.5.5 Contagem de *Staphylococcus* coagulase positivos

Inoculou-se 0,1 ml de cada diluição decimal (em duplicado), na superfície do meio de cultura “Baird Parker Agar” (BP) (Biokar) e procedeu-se ao seu espalhamento por toda a superfície do meio. Seguidamente, incubaram-se as placas numa estufa a 37 °C, durante 48 horas. As contagens das colónias foram realizadas após 48 h (ISO 6888-1,1999, Amd 1, 2003). Os resultados obtidos foram expressos em Log UFC/g.

2.2.5.6 Pesquisa de *Salmonella* sp.

A pesquisa de *Salmonella* sp. foi realizada de acordo com a norma ISO 6579 (2002). Pesou-se 25 g de amostra para um saco de stomacker e adicionou-se 225 ml de Água Peptonada Tamponada (APT) (Scharlau) (Pré-Enriquecimento). Homogeneizou-se a amostra durante 1 minuto e incubou-se a 37 °C, durante 18 a 20 horas. Pipetou-se 0,1 ml do pré-enriquecimento para 10 ml de meio “Rappaport Vassiliadis broth” (Merck) e 1 ml da amostra para 10 ml de meio “Muller Kauffmann Tetrathionate – Novobiocin broth” (MKTTn) (Oxoid) e incubou-se numa estufa a 41,5 °C e a 37 °C, respetivamente, durante 24 horas. Após o período de incubação, repicou-se, em duplicado, uma ansada para o meio de cultura “Brilliance Salmonella-Agar Base” (Oxoid) e para o meio “Xylose Lysine Deoxycholate Agar” (XLD) (Scharlau) e incubou-se numa estufa a 37 °C, durante 24 horas. Após o período de incubação, pesquisou-se a presença de colónias típicas que no caso do meio de cultura Brilliance são roxas e no caso de XLD são vermelhas. O crescimento de colónias típicas implicaria a sua confirmação recorrendo a testes bioquímicos e/ou moleculares adequados (ISO 6579, 2002).

2.2.5.7 Contagem de *Escherichia coli*

Inoculou-se 1 ml de cada diluição decimal (em duplicado), em cada placa, e incorporou-se no meio de cultura Chromocult Triptone Bile x-glucuronide (Chromocult TBX) (Merck), e incubaram-se as placas numa estufa a 44 °C, durante 24 horas. As contagens das colónias típicas foram realizadas após 24 h (ISO 16649-2, 2001).

2.2.6 Análises Sensoriais

Após a fermentação da couve e a realização das análises microbiológicas, para avaliação das condições de higiene e segurança das amostras, foram realizadas análises sensoriais com um painel de 18 provadores, não treinados, de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 20 e os 60 anos, habituados a provar alimentos fermentados. Numa sala de provas, equipada com unidades de prova individuais, ar condicionado à temperatura de 20 °C e sob luz branca incandescente, foi facultado a cada provador uma ficha de registo com os parâmetros a avaliar (Anexo I), um tabuleiro com as amostras A, B, C e AC (chouxcroute comercial), ou A', C', D e AC, codificadas aleatoriamente com números de três dígitos e um elemento de limpeza da cavidade bucal (água). Foi solicitado que classificassem os parâmetros organoléticos aspeto, cor, cheiro, dureza, acidez, teor em sal, sabor e

apreciação global, de acordo com uma escala hedónica de 5 pontos, em que: para os atributos aspeto, cor, cheiro, sabor e apreciação global, 1 indica Desagradável e 5 Muito bom ou Excelente; para a dureza, 1 indica Muito mole e 5 Muito dura; para a acidez, 1 indica Sem acidez e 5 Muito ácido; e para o teor de sal, 1 indica Insonso e 5 Muito salgado.

2.2.7 Análises Nutricionais

2.2.7.1 Determinação do Resíduo Seco e Teor de Humidade

O resíduo seco, expresso em percentagem, foi calculado de acordo com o método AOAC 934.01 (AOAC, 1990a). Pesaram-se aproximadamente 80 g ou 14 g de amostra, consoante se tratava de couve fresca ou fermentada ou de salicórnia, respetivamente. As amostras foram trituradas e secas em estufa (Selecta) a 105 °C, até se atingir um peso constante. O teor de humidade foi obtido por diferença, entre 100% e o resíduo seco. O ensaio foi realizado em triplicado.

2.2.7.2 Determinação do Teor em Lípidos

O teor em lípidos foi determinado seguindo o método AOAC 948.22 (AOAC, 2000). Transferiu-se o resíduo seco obtido anteriormente para um cartucho de extração (Schleicher & Schuell) e cobriu-se com algodão. Em seguida, colocou-se o cartucho no extrator de um aparelho Soxhlet, que se ligou a um balão, previamente seco e pesado, com algumas pérolas de vidro (reguladores de ebulição). Adicionou-se 150 ml de éter de petróleo ao extrator e iniciou-se a extração, sob refluxo, numa manta de aquecimento (Selecta), durante 6 horas. Após a extração, evaporou-se o éter de petróleo a 50 °C, num evaporador rotativo (Heidolph, Laborota 4000) e secou-se o balão numa estufa (Selecta) a 105 °C, durante 10 minutos. Por último, transferiu-se o balão para um exsiccador, até se atingir peso constante e pesou-se o balão numa balança analítica (Mettler, AE 200). O teor em lípidos foi expresso em percentagem, tendo o ensaio sido realizado em triplicado.

2.2.7.3 Determinação do Teor em Fibra

O teor em fibra foi determinado segundo o método AOAC 978.10 (AOAC, 2005), por digestões sucessivas ácida e básica, secagem e incineração. Assim, transferiu-se aproximadamente 4 g de amostra previamente seca e desengordurada para um balão volumétrico de 250 ml e adicionou-se 200 ml de ácido sulfúrico (0,25 N) e silicone antiespumante. Colocou-se o balão numa manta de aquecimento, ligou-se a um condensador e levou-se à ebulição, durante 30 minutos. Em seguida, procedeu-se à filtração da amostra, usando papel de filtro sem cinzas, e à lavagem com água destilada quente até que o pH fosse neutro. Voltou a transferir-se a amostra para um balão volumétrico e adicionou-se 200 ml de hidróxido de sódio (0,313 N). Levou-se à ebulição durante 30 minutos. Seguidamente, voltou a lavar-se e filtrar-se até que o pH fosse neutro. Depois, lavou-se a amostra com acetona para desidratá-la. Em seguida, transferiu-se a amostra para um cadinho, previamente seco e pesado e secou-se a amostra numa estufa (Selecta) a 105 °C, durante 2 horas. A amostra seca foi colocada num exsiccador até se atingir um peso constante. Depois de seca, pesou-se o cadinho com a amostra numa balança analítica (Mettler, AE 200). Seguidamente, colocou-se numa

mufra (Tecnilab) a 550 °C, durante 24 horas. Por último, colocou-se o cadinho com a amostra calcinada num exsiccador até se atingir peso constante e pesou-se na balança analítica. O ensaio foi realizado em triplicado. O teor em fibra, expresso em percentagem, foi determinado segundo a equação seguinte (Eq. 2):

$$Fibra\ bruta\ (\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \times 100 \quad (Eq. 2)$$

m_0 – massa inicial da amostra (g);

m_1 – massa da amostra seca (g);

m_2 – massa da amostra calcinada (g).

2.2.7.4 Determinação do Teor em Proteína

O teor de azoto total foi determinado pelo método de Kjeldahl, de acordo com o procedimento descrito no método AOAC 920.152 (AOAC, 1990b). Pesou-se aproximadamente 5 g ou 10 g de amostra previamente triturada, consoante se tratava de couve fresca ou fermentada ou salicórnia. Envolheu-se a amostra em papel de filtro sem cinzas, e colocou-se em tubo de digestão, juntamente com uma pastilha de catalisador de Kjeldahl, reguladores de ebulição, 3 gotas de silicone a 2% (antiespumante) e 25 ml de ácido sulfúrico 95-97%, e levou-se a digerir num digestor (Gerhardt Kjeldatherm). No início da digestão, deixou-se a temperatura atingir lentamente os 100 °C, aumentando-se depois mais 100 °C a cada 30 minutos, até à temperatura máxima de 400 °C. Deixou-se a amostra a digerir até se obter uma coloração verde límpida (aproximadamente 6 h). Seguidamente, retirou-se o tubo do digestor e deixou-se arrefecer até se atingir temperatura constante, adicionando-se depois 50 ml de água destilada. Num Erlenmeyer, colocou-se 50 ml de ácido bórico a 4% e 3 gotas de indicador misto (Tashiro). Transferiu-se o tubo de digestão para o destilador (Bicasa), e adicionou-se 100 ml de hidróxido de sódio a 40%, e iniciou-se a destilação, até se obter um volume de destilado de 150 ml. Por último, titulou-se o destilado com ácido clorídrico 0,1 N. O ensaio foi realizado em triplicado. O teor de azoto total da amostra, expresso em percentagem, foi calculado pela seguinte equação (Eq. 3):

$$Azoto\ total\ (\%) = \frac{0,14 \times (V_1 - V_2)}{m} \times 100 \quad (Eq. 3)$$

Em que:

V_1 – volume de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra (ml);

V_2 – volume de ácido clorídrico gasto no ensaio branco (ml);

m – massa de amostra (g).

O teor em proteína, expresso em percentagem, foi obtido por multiplicação do teor de azoto total pelo fator 6,25.

2.2.7.5 Determinação do Teor em Cinzas

O teor em cinzas, expresso em percentagem, foi determinado segundo o método AOAC 940.26 (AOAC, 1990c), por incineração de aproximadamente 5 g de amostra numa mufla (Tecnilab), à temperatura de 550 °C, até se obter peso constante. O ensaio foi realizado em triplicado.

2.2.7.6 Determinação do Teor em Hidratos de Carbono

O teor em hidratos de carbono foi obtido por diferença entre 100% e a soma das percentagens dos teores em humidade, proteína, lípidos, fibra e cinzas.

2.2.7.7 Determinação do Valor Calórico

O valor calórico, expresso em kcal por 100 g de amostra, foi calculado pela soma dos teores de proteína, hidratos de carbono, lípidos e fibra, multiplicados pelos fatores oficiais de conversão de Atwater (European Commission Directive 2008/100/EC, 2008), 4, 4, 9 e 2, respetivos.

2.2.7.8 Determinação do Teor em Minerais (Na, K e Ca)

Os teores de Na, K e Ca foram determinados por fotometria de chama (Jenway, PFP 7) de acordo com Saúde, Barros, Mateus, Quintas e Pires-Cabral (2017). A amostra previamente incinerada foi dissolvida com 6 ml de água desionizada de elevada pureza, água Milli-Q, ligeiramente acidificada com 2 ml de HCl 6N. Depois, filtrou-se com papel de filtro sem cinzas, para um balão volumétrico de 50 ml e perfez-se com água Milli-Q. As condições instrumentais foram ajustadas para cada mineral de acordo com as instruções do fotómetro. O instrumento foi previamente calibrado com soluções padrão (1.000 g/l AA standards, Panreac) de concentrações 0-30 ppm de Na, de 0-30 ppm de K e de 0-70 ppm de Ca. A amostra, previamente preparada e diluída, foi atomizada no fotómetro. Da leitura resultante e com base nas curvas de calibração traçadas para os três minerais calculou-se o teor de Na, K e Ca na amostra. O ensaio foi realizado em triplicado, e os resultados foram expressos em mg de catião por 100 g de amostra.

2.2.8 Análise Estatística

Os valores experimentais foram expressos como a média de várias medidas (consoante o método de análise) \pm o desvio padrão. Foi realizada análise de variância (ANOVA) para os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas e análise sensorial, e as médias foram comparadas pelo método de Scheffe. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. A análise estatística foi feita usando o software SPSS versão 24.0 (IBM SPSS Statistics 24.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Evolução da Fermentação

O estudo do processo fermentativo da couve branca foi seguido através da análise dos parâmetros físico-químicos de pH e acidez livre nos exsudados e cor na couve. A fermentação considerou-se finalizada após 20 dias, altura em que estes parâmetros (pH e acidez) atingiram valores estacionários e na gama referida por outros autores na produção de choucroute. O perfil de fermentação das couves ácidas processadas foi igualmente acompanhado pela variação da microbiota, em particular das populações dos microrganismos aeróbios mesófilos, das bactérias ácido-lácticas (BAL), dos fungos filamentosos e leveduras e dos coliformes totais.

3.1.1 pH e Acidez do Exsudado da Couve

Segundo Adams (1990) e Kandler (1983) o pH e a acidez são dois parâmetros importantes que indicam o progresso de uma fermentação.

Durante a fermentação da couve branca, em qualquer um dos ensaios experimentais realizados a diferentes concentrações de sal equivalente, usando sal de mesa, ensaio A (2,91% sal equivalente, ie 1,15% Na), usando salicórnia, ensaio B (1,56% sal equivalente, ie 0,34% Na) e usando salicórnia e sal de mesa, ensaio C (1,94% sal equivalente, ie 0,49% Na) observou-se uma diminuição do pH do exsudado da couve nos primeiros 8 dias de fermentação de $6,04 \pm 0,15$, $5,93 \pm 0,12$ e $5,77 \pm 0,06$, respetivamente, para valores aproximados de pH 4, que se mantiveram praticamente inalterados até ao final da fermentação, ao 20º dia, ie, $4,01 \pm 0,11$, $3,89 \pm 0,19$ e $3,99 \pm 0,07$, respetivamente (Fig. 3.1), tal como é referido por outros autores (Viander et al., 2003; Wolkers-Rooijackers et al., 2013; Xiong, Guan, Song, Hao & Xie, 2012, 2014, 2016). A partir de uma análise estatística pode-se verificar que os valores de pH das couves ácidas não eram significativamente diferentes entre si, mas eram significativamente menores que os respetivos valores iniciais ($p < 0,05$). A utilização de salicórnia em substituição do sal de mesa conduziu a uma diminuição do pH, tendo-se atingido valores da mesma gama dos medidos no ensaio controlo.

Simultaneamente, observou-se um aumento progressivo da acidez até sensivelmente ao 14º dia de fermentação, mantendo-se depois praticamente constante, sendo que no início da fermentação a acidez (expressa em g ácido láctico/100 ml) era $0,053 \pm 0,007$, $0,097 \pm 0,006$ e $0,043 \pm 0,008$, e no final $0,757 \pm 0,008$, $0,991 \pm 0,008$ e $0,781 \pm 0,008$, nos ensaios A, B e C respetivamente (Fig. 3.1). O aumento de acidez observado em qualquer das experiências era estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Nos ensaios da fermentação B, tanto a acidez inicial como a final eram significativamente maiores que os respetivos valores medidos nos ensaios A e C, sugerindo que a ausência de sal de mesa por substituição total com salicórnia contribui também para a acidificação do produto.

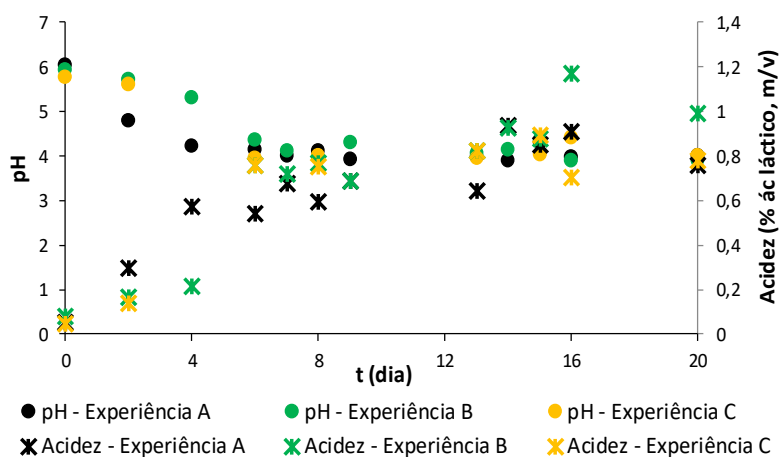


Figura 3.1 Variação do pH e da acidez do exsudado durante a fermentação de couve branca nas experiências: A – ensaio controlo realizado com sal de mesa; B – ensaio realizado com salicórnia; C – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia.

De acordo com Viander et al. (2003) e Xiong et al. (2014) é de esperar uma rápida acidificação da salmoura na produção de choucroute, durante a primeira fase da fermentação, devido à elevada produção de ácido láctico e de outros ácidos orgânicos, resultantes do metabolismo das BAL e outras bactérias. Estes autores referem ainda que uma rápida descida do pH durante a primeira fase da fermentação é importante, no sentido em que minimiza a atividade de bactérias indesejáveis e deteriorantes, contribuindo para manter a qualidade do produto final. Seguidamente, numa segunda fase da fermentação, a diminuição do pH ocorre lentamente até se atingir valores inferiores a 4, observando-se simultaneamente um aumento ligeiro e progressivo da acidez.

3.1.2 Parâmetros da Cor

A cor de um produto alimentar é o primeiro parâmetro de qualidade avaliado pelo consumidor, por isso é importante estudar o efeito que o processamento dos alimentos tem sobre esta característica.

A cor da couve dos ensaios A, B e C realizados foi avaliada ao longo da fermentação através dos parâmetros de luminosidade (L), graduação da cor vermelho (+100) para o verde (-100) (a) e tonalidade da cor (b). A interpretação da evolução dos valores medidos de b , graduação dos tons azul (-100) a amarelo (+100) e de c , saturação ou vivacidade da cor, não é razoável pela sua variação e ausência de tendência ao longo da fermentação, facto que poderá estar relacionado com a pouca ou nenhuma relação que a graduação da cor amarelo/azul tem com a própria cor da amostra.

Ao longo da fermentação observou-se que a luminosidade diminuiu ligeiramente, conforme se traduz no gráfico da Figura 3.2i, de valores $54,95 \pm 2,47$, $48,50 \pm 2,11$ e $46,82 \pm 3,28$ para $52,55 \pm 0,86$, $44,37 \pm 1,02$ e $45,80 \pm 3,42$, consoante se tratava dos ensaios de fermentação A, B ou C, respetivamente. A luminosidade da couve com sal e da respetiva couve ácida (experiência A) não se alterou significativamente com a fermentação, porém, estes valores eram significativamente maiores que os respetivos valores medidos nas experiências B e C ($p < 0,05$). Ao que parece, a adição de salicórnia à couve por substituição total ou parcial do sal de mesa, reduziu a luminosidade dos

produtos. Além disso, na ausência de sal, a couve ácida fermentada apresentou uma luminosidade significativamente menor que a couve com salicórnia inicial. Apesar da fermentação conduzir à diminuição da luminosidade, esta alteração não foi estatisticamente significativa na presença de sal (ensaios A e C).

As cores esverdeadas das folhas de couve com e sem salicórnia tornaram-se menos verdes, ao longo da fermentação, ou seja, os valores do parâmetro a de todos os ensaios realizados aumentaram significativamente (Fig. 3.2ii), variando de $-2,5 \pm 0,5$ para $0,6 \pm 0,2$ (ensaio A), de $-2,1 \pm 0,6$ para $0,4 \pm 0,2$ (ensaio B) e $-2,6 \pm 0,6$ para $0,7 \pm 0,6$ (ensaio C). Esta alteração poderá estar associada à acidificação ocorrida durante a fermentação, responsável pela degradação da clorofila tanto da couve como da salicórnia. Segundo Bongoni, Verkerk, Steenbekkers, Dekker & Sieger (2014), durante o processamento de vegetais, a clorofila é convertida em feofitina e pirofeofitina, alterando a cor dos vegetais de verde brilhante para uma cor de verde ervilha. Outros autores referem que a alteração da cor durante o processamento de vegetais, está não só associada à degradação da clorofila mas também à alteração da superfície de refletância e profundidade de penetração da luz que ocorre por efeito da perda de ar e de outros gases dissolvidos nos vegetais (Tijssens, Schijvens & Biekman, 2001). Os valores da cor inicial medida nas experiências A, B e C não foram significativamente diferentes entre si, assim como da cor das respectivas couves fermentadas.

Ao longo da fermentação observou-se uma diminuição significativa da tonalidade da cor, h , em qualquer um dos ensaios realizados (Fig. 3.2iii), de 101 ± 3 para 88 ± 2 , (ensaio A), de 106 ± 2 para 87 ± 2 (ensaio B) e de 104 ± 4 para 85 ± 4 (ensaio C). Os valores medidos parecem sugerir que a incorporação de salicórnia aumenta a tonalidade das amostras iniciais, porém as alterações ocorridas durante a fermentação atenuam as diferenças de tonalidade entre as couves ácidas obtidas no final dos processos.

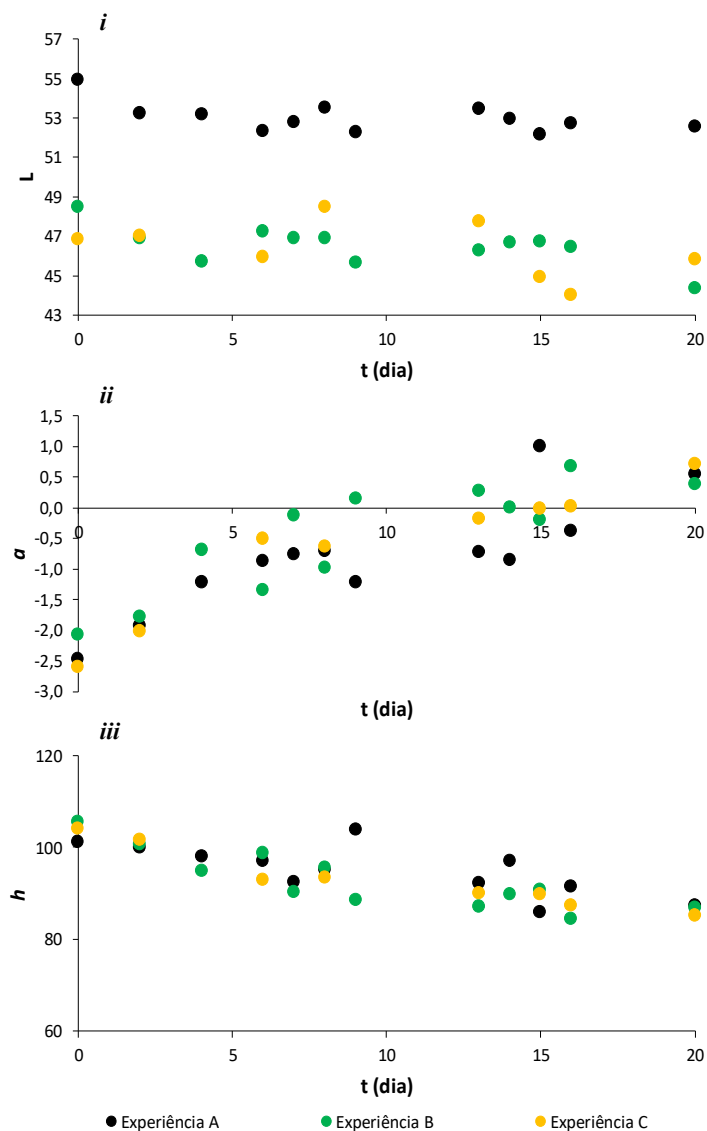


Figura 3.2 Variação dos parâmetros da cor, luminosidade L (3.2i), graduação da cor verde/vermelho a (3.2ii) e tonalidade h (3.2iii) durante a fermentação de couve branca nas experiências: A – ensaio controlo realizado com sal de mesa; B – ensaio realizado com salicórnia; C – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia.

3.1.3 Microbiota

No início da fermentação (dia 0) o número de unidades formadoras de colónias de microrganismos mesófilos aeróbios era baixo, observando-se valores de $3,6 \pm 0,5$ Log UFC/g, $3,9 \pm 0,3$ Log UFC/g e $3,9 \pm 0,6$ Log UFC/g, nos ensaios A, B e C, respetivamente. Estes valores podem ser justificados pelos resultados obtidos nas análises realizadas à matéria-prima utilizada, 3 ± 1 Log UFC/g na couve branca e $3,9 \pm 0,7$ Log UFC/g na salicórnia. A adição de salicórnia à couve, nos ensaios B e C, parece ser responsável por uma maior população de microrganismos, apesar dos valores não serem estatisticamente diferentes. Ao 2º dia de fermentação o Log do número de unidades formadoras de colónias por grama aumentou para $6,1 \pm 0,5$, $7,31 \pm 0,01$ e $7,7 \pm 0,2$ nas experiências A, B e C respetivamente. Depois, observou-se uma variação ligeira dos valores, traduzida num patamar,

conforme se pode observar na Figura 3.3. No final da fermentação, o Log UFC/g das couves ácidas obtidas nos ensaios A, B e C, era $5,5 \pm 0,1$, $7,2 \pm 0,8$ e $6,7 \pm 0,6$, respetivamente. Estes valores são significativamente maiores que os valores respetivos nas misturas de vegetais por fermentar, não havendo diferenças significativas entre aquelas que foram fermentadas com salicórnia, mas apenas entre estas e a couve fermentada tradicionalmente com sal de mesa. Com efeito, as couves ácidas obtidas na presença de salicórnia e, conseqüentemente, com menor concentração de sal equivalente, ensaios C – 1,94% e B – 1,56%, apresentam populações microbianas superiores à da couve ácida obtida por fermentação tradicional (ensaio A – 2,91%), tal como foi também observado por Wolkers-Rooijackers et al. (2013) quando estudou o efeito da redução do sódio na fermentação e qualidade de chouxcroute.

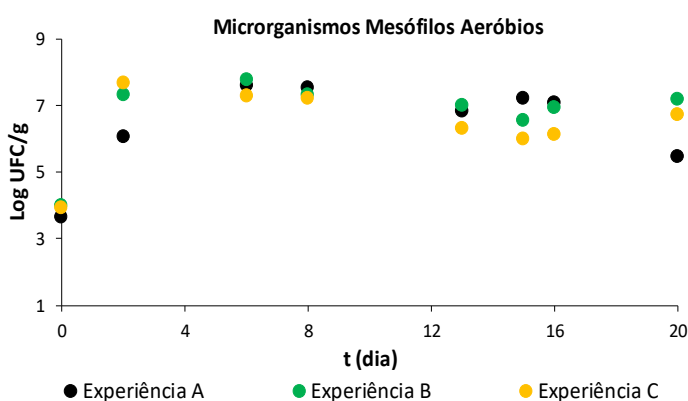


Figura 3.3 Variação da população de microrganismos mesófilos aeróbios durante a fermentação de couve branca nas experiências: A – ensaio controlo realizado com sal de mesa; B – ensaio realizado com salicórnia; C – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia.

As populações de bactérias ácido-lácticas (BAL), responsáveis pela fermentação ácido-láctica, foram monitorizadas ao longo do processo de produção da couve ácida, mostrando uma tendência semelhante à observada para as populações de microrganismos mesófilos (Fig. 3.4). Esta tendência foi também observada por Wolkers-Rooijackers et al. (2013), que referem que a microbiota na fermentação do chouxcroute era dominada por BAL. Inicialmente o número de unidades formadoras de colónias de BAL era muito baixo, $1,5 \pm 0,7$ Log UFC/g, $1,6 \pm 0,8$ Log UFC/g e $1,6 \pm 0,8$ Log UFC/g nos ensaios A, B e C, respetivamente, sendo que nas matérias-primas, couve branca e salicórnia este grupo bacteriano não foi detectado ($< 1 \pm 0$ Log UFC/g). Numa primeira fase da fermentação, a população de BAL aumentou rapidamente, apresentando valores máximos ao 2º dia para o ensaio C ($7,8 \pm 0,4$ Log UFC/g) e ao 6º dia para os ensaios A ($7,6 \pm 0,6$ Log UFC/g) e B ($7,8 \pm 0,4$ Log UFC/g). De acordo com Xiong et al. (2012), o rápido crescimento da população de BAL pode dever-se à formação gradual de um ambiente anaeróbico devido ao consumo de oxigénio pelos microrganismos aeróbios existentes na matéria prima. A taxa de aumento da população de BAL nas experiências A e B é menor que a observada na experiência C. Com efeito, no ensaio A a concentração de sal utilizada era maior que a do ensaio C e a acidificação também ocorreu mais rapidamente, observando-se por isso um crescimento mais lento da população de BAL no ensaio A. O mesmo não se pode dizer

relativamente ao ensaio B, pois foi realizado com menor teor de sal e a acidificação observada foi mais lenta. Nos restantes dias de fermentação observou-se uma ligeira diminuição da população de BAL nos três ensaios A, B e C para valores de $5,4 \pm 0,1$ Log UFC/g, $6,59 \pm 0,03$ Log UFC/g e 6 ± 1 Log UFC/g, respetivamente. Apesar da diferença entre estes valores não ter significado estatístico, é no ensaio B, onde o teor de sal equivalente utilizado era menor e onde se tinha utilizado apenas salicórnia, que se observa a maior população de BAL. Certamente a ausência de sal de mesa condiciona o crescimento destes microrganismos. Estatisticamente pode-se dizer que: a população de BAL aumentou significativamente com a fermentação ($p < 0,05$) em qualquer um dos ensaios realizados, as populações de BAL existentes nas couves ácidas das experiências A, B e C não são significativamente diferentes, apesar do valor superior observado nas experiências B e C (principalmente em B), o que sugere que a substituição do sal de mesa por salicórnia pode ter contribuído para o aumento considerável do número de colónias de BAL no produto final. A salicórnia utilizada talvez possua uma variedade e disponibilidade de micronutrientes que tenham facilitado o crescimento das BAL.

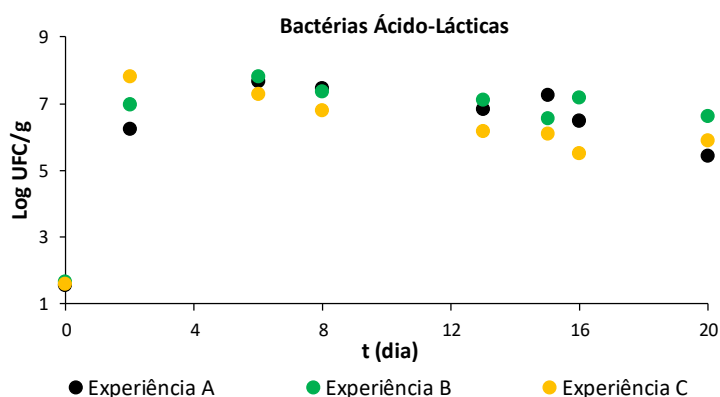


Figura 3.4 Variação da população de bactérias ácido-láticas (BAL) durante a fermentação de couve branca nas experiências: A – ensaio controlo realizado com sal de mesa; B – ensaio realizado com salicórnia; C – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia.

Acompanhando a evolução da fermentação por contagem do número de unidades formadoras de colónias de fungos filamentosos e leveduras, verificou-se que no início da fermentação existiam $1,6 \pm 0,2$ Log UFC/g, $3,3 \pm 0,3$ Log UFC/g e $3,1 \pm 0,3$ Log UFC/g nos ensaios A, B e C, respetivamente. A presença de salicórnia nos produtos por fermentar (nos ensaios B e C) parece ter sido responsável pelos valores significativamente maiores destes microrganismos ($p < 0,05$). Com efeito, os resultados obtidos na enumeração destes microrganismos na couve e na salicórnia, mostra que a salicórnia possuía uma população de fungos mais numerosa, pois apresentava valores de $4,9 \pm 0,1$ Log UFC/g, enquanto que a couve apresentava 3 ± 1 Log UFC/g. No ensaio de fermentação tradicional da couve (A) observou-se um aumento da população de fungos até ao 2º dia ($2,4 \pm 0,9$ Log UFC/g). A partir do 6º dia de fermentação já não se detetaram colónias de fungos filamentosos e de leveduras (inferior ao limite de deteção), conforme se pode observar no gráfico da Figura 3.5. Presume-se que o desaparecimento destes microrganismos se deve ao ambiente anaeróbio (Wendy, Ilénys & Pérez,

2012; Xiong et al., 2014), à produção de peróxidos (Pawlowska, Zannini, Coffey & Arendt, 2012), à diminuição do pH e ao aumento da acidez (Xiong et al., 2016), resultantes da atividade das BAL ao longo da fermentação. Os fungos, quando estão presentes, produzem pectinases, enzimas que degradam a pectina das folhas de couve, e que vão contribuir para o amolecimento do choucroute e conferir-lhe um sabor desagradável (Etchells, Bell, Monroe, Masley & Demain, 1958), por isso estes microrganismos são considerados indesejáveis na fermentação de couve ácida (Zhao & Ding, 2008; Wouters, Bernaert, Conjaerts, Droogenbroeck, Loose & Vuyst, 2013).

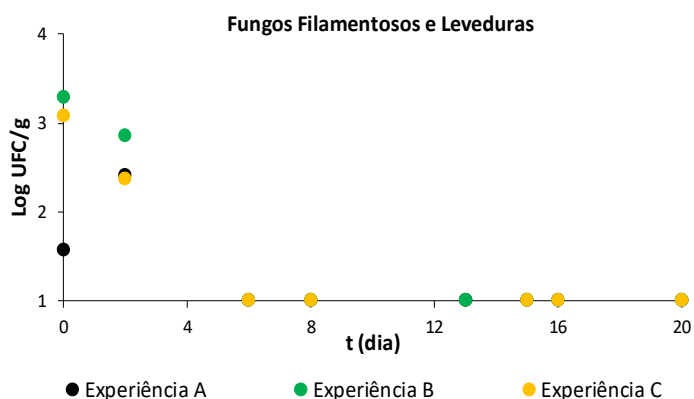


Figura 3.5 Variação da população de fungos filamentosos e leveduras durante a fermentação de couve branca nas experiências: A – ensaio controle realizado com sal de mesa; B – ensaio realizado com salicórnia; C – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia.

O número de unidades formadoras de colónias de coliformes totais no início da fermentação de couve nos ensaios A, B e C realizados era baixo, de $1,4 \pm 0,5$ Log UFC/g, $2,0 \pm 0,3$ Log UFC/g e $2,8 \pm 0,4$ Log UFC/g, respetivamente. Observou-se um aumento das populações até ao 6º dia, com valores máximos de $4,3 \pm 0,8$ Log UFC/g, $4,7 \pm 0,1$ Log UFC/g e $5,0 \pm 0,5$ Log UFC/g, nos ensaios A, B e C, respetivamente, após o que se observou um declínio, até que ao 15º dia, altura em que se deixaram de detetar (Fig. 3.6). Estatisticamente, o número de coliformes presente na couve a fermentar com sal e salicórnia (ensaio C) era significativamente maior que a população destes microrganismos presente na couve a fermentar somente com salicórnia (ensaio B), e por sua vez significativamente maior que a população de coliformes na couve a fermentar com sal (ensaio A) ($p < 0,05$). O desaparecimento de coliformes deve-se, provavelmente, à acidificação e à produção de substâncias antimicrobianas por parte das BAL, tais como os ácidos, os peróxidos e as bacteriocinas que ocorre durante a fermentação ácido-láctica (Hutkins, 2006).

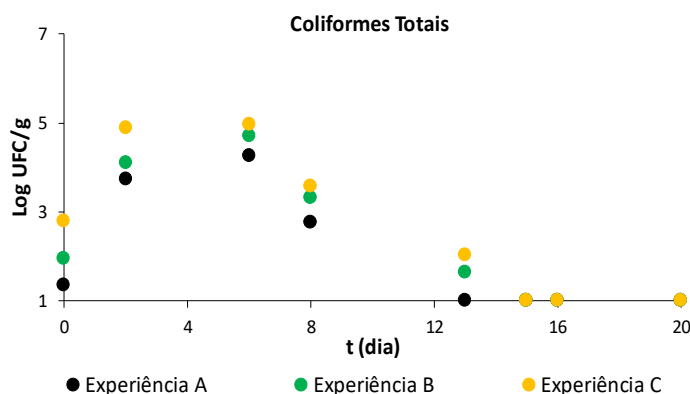


Figura 3.6 Variação da população de coliformes totais durante a fermentação de couve branca nas experiências: A – ensaio controle realizado com sal de mesa; B – ensaio realizado com salicórnia; C – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia.

Foram igualmente analisadas amostras da matéria-prima, couve e salicórnia, e produtos finais das fermentações conduzidas segundo os ensaios A, B e C, no que respeita à presença de *Staphylococcus* coagulase positivos, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. (EC, 2005). Os resultados demonstraram ausência destes microrganismos em qualquer das amostras estudadas. De acordo com Xiong et al. (2016), a concentração de sal, o pH e a atividade da população de BAL inibem o crescimento destes microrganismos. Kim, Song, Yook, Ryu & Byun (2004) e Li, Ning, Liu, Yan, Wang & Wang (2015) referem ainda que a produção de ácido láctico, de ácido fenilático e de bacteriocinas pelas BAL é igualmente responsável pela inibição do crescimento de microrganismos patogénicos indesejáveis.

3.2 Couve Ácida Obtida por Fermentação

Após 20 dias de fermentação, procedeu-se à caracterização dos produtos finais obtidos nos vários ensaios realizados a diferentes concentrações de sal equivalente, através do estudo de parâmetros físico-químicos, atributos sensoriais e composição nutricional da couve ácida fermentada com melhor avaliação sensorial.

3.2.1 Caracterização Físico-química

A couve ácida ou o exsudado foram caracterizados em relação à atividade da água (a_w), à salinidade, aos sólidos solúveis totais (SST), à textura, nomeadamente a dureza e o trabalho realizado na compressão, à concentração em compostos fenólicos totais e à atividade antioxidante, medida pela concentração de Trolox ou EC_{50} . Os resultados obtidos em cada um dos ensaios de fermentação realizados, utilizando sal de mesa (A), salicórnia (B) e salicórnia e sal de mesa (C) apresentam-se na Tabela 3.1 e foram comparados com os valores medidos nos preparados iniciais, antes da fermentação.

Tabela 3.1 Características físico-químicas da couve ácida obtida por fermentação segundo os ensaios A – ensaio controle realizado com sal de mesa (2,91% sal equivalente); B – ensaio realizado com salicórnia (1,56% sal equivalente) e C – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia (1,94% sal equivalente).

Parâmetros	Ensaio A		Ensaio B		Ensaio C	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Salinidade	5,9±0,2 ^c	8,47±0,09 ^d	4,1±0,5 ^{a,b}	4,8±0,6 ^b	3,7±0,2 ^a	4,70±0,08 ^b
a_w	0,951±0,003 ^b	0,946±0,001 ^a	0,962±0,002 ^d	0,960±0,001 ^{c,d}	0,964±0,004 ^d	0,957±0,001 ^c
SST	6,8±0,2 ^c	9,9±0,2 ^d	4,9±0,5 ^a	5,8±0,5 ^b	4,4±0,2 ^a	5,65±0,04 ^b
Dureza (N)	3,3±0,4 ^{a,b}	4,7±0,4 ^c	3,7±0,6 ^{a,b,c}	4,3±0,9 ^{b,c}	2,7±0,5 ^a	4,4±0,7 ^{b,c}
Trabalho (mN.m)	5,7±0,7 ^a	8±1 ^{b,c}	6,3±0,8 ^{a,b}	10±1 ^c	7±1 ^{a,b}	10±2 ^c
Comp. Fenólicos (mg ác gálico/100g)	-	31,6±0,5 ^a	-	34,9±0,9 ^b	-	37,4±0,1 ^c
Ativ Antioxidante (mmol Trolox/100g)	-	2,69±0,05 ^a	-	3,04±0,04 ^b	-	3,63±0,09 ^c
EC_{50} (g/ml)	-	1,3±0,1 ^a	-	0,78±0,09 ^b	-	0,60±0,01 ^c

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Scheffe ($p < 0,05$)

A salinidade é uma medida do teor de sais na amostra analisada. No início da fermentação, a salinidade na experiência A era significativamente maior que as de B e C ($p < 0,05$), correspondendo igualmente às diferenças entre as % de sal equivalente utilizadas (Tabela 3.1). A fermentação conduziu a um aumento da salinidade, que se mostrou significativamente diferente nas experiências A e C, isto é, nas experiências realizadas na presença de sal (Tabela 3.1). Ao que parece, as alterações físico-químicas propiciadas pela ação dos microrganismos durante a fermentação contribuíram para aumentar a concentração de sais disponíveis. Além disso, o sal é responsável pela lixiviação dos compostos hidrossolúveis (açúcares, ácidos orgânicos, vitaminas e sais minerais) das folhas de couve para o exsudado durante a fermentação, e, quanto maior for a sua concentração maior é a difusão destes compostos, por isso justifica-se que nos ensaios realizados com maior teor de sal de mesa (A e C) a salinidade das couves ácidas tenha sido maior. Após a fermentação, as amostras de couve ácida obtidas nas experiências B e C apresentaram salinidades significativamente menores que a couve ácida obtida da experiência A ($p < 0,05$) (Tabela 3.1), sugerindo que a incorporação de salicórnia no preparado inicial realizado nas experiências B e C foi responsável pela diminuição da salinidade, provavelmente porque parte dos sais que os preparados contêm concentram-se na polpa da salicórnia e estão menos disponíveis.

A a_w dá indicação da água disponível que a amostra analisada contém. Comparando os preparados iniciais, verificou-se que no ensaio A, onde se utilizou apenas couve e sal de mesa, na concentração de aproximadamente 3%, a a_w foi significativamente menor que os valores encontrados nos preparados de couve e salicórnia (sem adição de sal de mesa), ensaio B, e de couve, sal e salicórnia, ensaio C ($p < 0,05$) (Tabela 3.1). Estes resultados justificam-se devido à presença de maior teor de sal no ensaio A e à incorporação de salicórnia nos ensaios B e C, que lhes conferiu maior teor de água. No final da fermentação, a a_w foi significativamente menor que no início ($p < 0,05$), para qualquer um dos ensaios realizados, devido à perda de água das folhas de couve durante a fermentação (Tabela 3.1).

Os SST estão relacionados com a quantidade de açúcares livres dissolvidos no exsudado da couve. Inicialmente, o preparado de couve com sal de mesa (ensaio A) apresentava um valor de SST significativamente maior que o medido nos outros preparados com salicórnia (ensaios B e C) ($p < 0,05$) (Tabela 3.1). Durante a fermentação, ocorre solubilização e difusão de compostos, nomeadamente açúcares, das folhas de couve e da salicórnia para o exsudado, podendo depois ser metabolizados pelas BAL. Por isso, após a fermentação, os SST foram significativamente maiores que os respetivos valores iniciais ($p < 0,05$) (Tabela 3.1). Além disso, quanto maior é a % de sal ($A > B, C$), tanto maior é o teor em SST, pois é o sal que promove a difusão dos compostos solúveis por efeito da diferença de pressão osmótica entre as células da couve e o meio exterior.

Xiong et al. (2016), estudaram o efeito da concentração do sal (2%, 5% e 8%) na fermentação de couve e verificaram que ao longo da fermentação a concentração de glucose e frutose aumentou significativamente. Os teores finais destes açúcares nas fermentações conduzidas a concentrações de sal de 2% e 5% não eram significativamente diferentes, contudo eram significativamente menores que os respetivos valores observados na fermentação realizada a 8% de sal, sugerindo que a esta elevada concentração haveria abrandamento do metabolismo das BAL. Wolkers-Rooijackers et al. (2013) estudaram o efeito da redução do sódio na fermentação e qualidade do choucroute, tendo realizado três experiências: A - controlo, 15 g NaCl/kg; B - redução de 40% de NaCl, 9 g NaCl/kg e C - redução de 40% de Na, 15 g/kg de mistura salina isotónica, constituída por 9 g NaCl/kg, 4,5 g KCl/kg, 0,75 g MgCl₂/kg e 0,75 g CaCl₂/kg e observaram que inicialmente a concentração de açúcares totais era significativamente maior no ensaio A, seguido do ensaio C e finalmente do ensaio B, confirmando os resultados obtidos neste trabalho. Porém, após a fermentação a concentração de açúcares totais era significativamente menor que os respetivos valores observados inicialmente, não havendo diferenças significativas entre os ensaios A e B mas apenas entre estes e o ensaio C, com menor concentração.

A textura de uma amostra pode ser avaliada instrumentalmente pela determinação de vários parâmetros, dois dos quais são a dureza da amostra e o trabalho que se realiza na compressão da amostra. É de esperar que o choucroute apresente uma textura *crispy* (Wolkers-Rooijackers et al., 2013), isto é que as folhas de couve sejam duras e que o trabalho realizado para as comprimir seja elevado. Apesar dos valores da dureza dos preparados A, B e C antes da fermentação serem diferentes, não têm significado estatístico ($p < 0,05$) (Tabela 3.1). Porém, a fermentação conduziu a um endurecimento considerável e significativo das amostras ($p < 0,05$), sendo a couve ácida fermentada tradicionalmente (ensaio A) a mais dura de todas (Tabela 3.1). Relativamente ao trabalho realizado para comprimir as amostras, não se detetaram diferenças significativas entre os preparados iniciais A, B e C ($p < 0,05$). No entanto, a fermentação provocou um aumento no trabalho realizado para comprimir as amostras de couve ácida (Tabela 3.1). Comparando os produtos finais, as couves ácidas com salicórnia (B e C) apresentaram valores de trabalho mais elevados que a couve ácida obtida por fermentação tradicional com sal de mesa (A), mas estas diferenças não têm significado estatístico ($p < 0,05$) (Tabela 3.1). A incorporação de salicórnia no preparado parece não afetar significativamente a medida instrumental da textura.

Wolkers-Rooijackers et al. (2013) ao estudarem o impacto da redução do teor de sódio no perfil de fermentação e na qualidade do chouxcroute obtido, verificaram que na experiência controlo (A) após a fermentação e armazenamento, o chouxcroute era mais *crispy* que os obtidas nas experiências B e C, além disso constatou que a dureza e o trabalho realizado para comprimir a amostra de chouxcroute da experiência B era muito menor que os valores medidos nas duas outras experiências. Por sua vez o produto obtido na experiência C apresentava maiores dureza e trabalho (dureza = 74 N, 56 N ou 136 N e trabalho = 661 N.s, 504 N.s ou 1228 N.s, para os chouxcroutes A, B e C, respetivamente). Os resultados obtidos por estes autores vêm confirmar os resultados obtidos neste trabalho.

A razão encontrada por Wolkers-Rooijackers et al. (2013) para o baixo valor de dureza do chouxcroute obtido na experiência B é a menor pressão osmótica quando o teor de sal utilizado na fermentação é menor (9 g NaCl/kg), ou seja, uma pressão osmótica elevada propicia a extração de maior quantidade de exsudado das células das folhas de couve, tornando-as mais firmes. Esta explicação também pode justificar o valor mais baixo de dureza da couve ácida B obtida no presente trabalho (couve fermentada com salicórnia, com 1,56% de NaCl equivalente). Nesta experiência, para que ocorra a formação de exsudado da couve é necessário que a própria salicórnia liberte água e sais minerais que vão depois exercer uma pressão osmótica sobre as células das folhas de couve e viabilizar a produção de exsudado e o endurecimento da couve. Este processo é muito mais complexo que o ocorrido na produção das couves ácidas A e C, porque tanto na experiência A como na experiência C utilizou-se sal de mesa, além de que em qualquer uma das experiências a concentração de sal equivalente é maior, 2,91% e 1,94%, respetivamente.

Analizadas as matérias-primas, couve branca e salicórnia, quanto à concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante, observou-se que a couve era mais rica em compostos fenólicos e apresentava maior atividade antioxidante que a salicórnia, com teores de $24,2 \pm 0,5$ mg ácido gálico/100 g e $1,6 \pm 0,1$ mmol Trolox/100 g, respetivamente, em comparação com $13,1 \pm 0,4$ mg ácido gálico/100 g e $1,02 \pm 0,04$ mmol Trolox/100 g, respetivamente. A fermentação provocou um aumento significativo na concentração de compostos fenólicos, e por isso, na atividade antioxidante. Com efeito, tanto a couve como a salicórnia, apresentavam menor teor em compostos fenólicos e atividade antioxidante que os produtos fermentados, sendo esta diferença significativa ($p < 0,05$) (Tabela 3.1). De facto, houve um aumento de 30,6%, 44,2% ou 54,5% na concentração de compostos fenólicos, consoante se tratava da fermentação A, B ou C, correspondendo a 1,7, 1,9 ou 2,3 vezes mais atividade antioxidante. Estes resultados estão em concordância com os observados por Peñas et al. (2012b). Além disso, os valores observados nas couves ácidas das experiências A, B e C são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$), sendo a couve ácida da experiência C a que apresentou maior concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante, seguindo-se a couve ácida B e finalmente a obtida na experiência A ($37,3 \pm 0,1$ ou $34,9 \pm 0,9$ ou $31,7 \pm 0,5$ mg ácido gálico/100 g, respetivamente, e, $3,63 \pm 0,09$, ou $3,04 \pm 0,04$ ou $2,69 \pm 0,05$ mmol Trolox/100 g, respetivamente). Estes resultados sugerem que a incorporação de salicórnia conduz a um aumento dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante na couve fermentada, apesar da salicórnia

apresentar, enquanto matéria-prima, menor teor de compostos fenólicos que a própria couve. A biodisponibilidade dos compostos fenólicos pode ser apontada como uma razão para esta observação. Os compostos fenólicos presentes na salicórnia fresca podem ter uma baixa biodisponibilidade por se encontrarem ligados a agentes quelantes (Gargouri, Magné, Dauvergne, Ksouri, El Fleki, Metges, et al., 2013), mas a fermentação pode propiciar a liberação destes compostos aumentando a sua biodisponibilidade.

Lee, Boyce & Breadmore (2011) confirmam os resultados observados neste trabalho, pois referem que o chouxcroute apresenta maior atividade antioxidante que a sua matéria-prima, devido à capacidade das BAL hidrolisarem os compostos polifenólicos, que existem em elevadas concentrações na couve, noutros compostos mais simples e com maior atividade antioxidante. Reyes, Villareal & Cisneros-Zeballos (2007) indicam ainda que a atividade antioxidante do chouxcroute pode ser maximizada pelo corte preparativo da couve antes de fermentar, provavelmente porque este processo facilita a difusão dos compostos fenólicos da couve para o meio exterior durante a fermentação, criando melhores condições para a atividade das BAL.

Vários autores referem que durante a fermentação de couve são formados derivados de glucosinolatos, tais como isotiocuanatos, índole-3-carbinol, índole-3-acetonitrilo e em maior abundância ascorbigeno, que têm a capacidade de eliminar radicais livres que causam a destruição celular, ampliando o efeito antioxidante da matéria-prima (Ciska & Pathak, 2004; Martinez-Villaluenga, Peñas, Frias, Ciska, Honke, Piskula, et al., 2009; Wagner & Rimbach, 2009; Peñas et al., 2010b; Cabello-Hurtado, Gicquel & Esnault, 2012).

O parâmetro EC_{50} foi usado igualmente como medida da atividade antioxidante, tendo-se observado que, não havia diferenças significativas entre os valores quantificados para as matérias-primas, $2,4 \pm 0,3$ e $2,3 \pm 0,2$ g/ml para a couve e salicórnia, respetivamente, a fermentação diminuiu significativamente os valores deste parâmetro, sugerindo maior atividade antioxidante nos produtos fermentados e das três fermentações realizadas, a couve ácida da experiência A apresenta um valor de EC_{50} significativamente maior que os observados nas experiências B e C ($p < 0,05$) (Tabela 3.1), concordando com os resultados acima referidos.

3.2.2 Caracterização Organolética

A Figura 3.7 representa a avaliação sensorial das couves fermentadas (A, B e C) e de um chouxcroute comercial, realizada por um painel de 18 provadores não treinados, que utilizaram uma escala hedónica de 5 pontos, em que: para os atributos aspeto, cor, cheiro, sabor e apreciação global, 1 indica Desagradável e 5 Muito bom ou Excelente; para a dureza, 1 indica Muito mole e 5 Muito dura; para a acidez, 1 indica Sem acidez e 5 Muito ácido e para o teor de sal, 1 indica Insonso e 5 Muito salgado.

Os provadores não encontraram diferenças significativas entre as couves fermentadas A, B e C e o chouxcroute comercial, no que respeita aos atributos sabor ($2,9 \pm 0,9$, $3,1 \pm 0,9$, $3,3 \pm 0,8$ e $3,3 \pm 0,9$, respetivamente), apreciação global ($3,0 \pm 0,8$, $3,3 \pm 0,8$, $3,4 \pm 0,6$ e $3,4 \pm 0,9$, respetivamente), aspeto

(3 ± 1 , 4 ± 1 , 4 ± 1 e $3,9\pm0,7$, respectivamente), cor (4 ± 1 , 4 ± 1 , 4 ± 1 e $3,8\pm0,8$, respectivamente) e aroma (3 ± 1 , 3 ± 1 , $3,7\pm0,9$ e 3 ± 1 , respectivamente), mas consideraram o chouxcroute comercial significativamente mais ácido (4 ± 1) que as couves fermentadas A, B e C ($2,8\pm0,9$, $2,7\pm0,8$ e $2,7\pm0,8$, respectivamente), não havendo diferenças significativas entre estas relativamente a este atributo ($p<0,05$). Porém, quanto à dureza e ao teor de sal havia diferenças estatisticamente significativas entre as couves ácidas ($p<0,05$). A couve fermentada com sal de mesa, A, era a mais dura ($3,6\pm0,8$) e a mais salgada ($2,8\pm0,8$), a couve fermentada com salicórnia, com 1,56% de sal equivalente, experiência B, era a menos dura ($3,0\pm0,7$) e a couve fermentada com 1,94% de sal equivalente, experiência C, era a menos salgada ($2,2\pm0,4$).

A dureza das couves ácidas é influenciada pela concentração de sal utilizada na fermentação, sendo maior quanto maior for a concentração de sal. Com efeito, a couve da experiência A era mais dura e mais salgada pois tinha sido fermentada com 2,91% de sal equivalente, usando somente sal de mesa. A couve da experiência B tinha sido fermentada com 1,56% de sal equivalente, usando apenas salicórnia, por isso era mais mole que as couves A e C, pois tinha menor teor de sal. A percepção do salgado pelo painel de provadores não foi tão apurada como para a dureza, pois não identificou esta couve fermentada (B) como a menos salgada, tendo considerado menos salgada a couve C, cujo teor de sal equivalente era 1,94%.

De uma maneira geral, pode concluir-se da análise sensorial que a couve ácida obtida segundo a experiência C reunia a melhor avaliação, com classificações de $3,3\pm0,8$; $3,4\pm0,6$; 4 ± 1 ; 4 ± 1 ; $3,7\pm0,9$ para os atributos sabor, apreciação global, aspeto, cor, aroma, indicando que os provadores consideraram a couve fermentada entre agradável e muito boa; $2,7\pm0,8$ para o atributo acidez, indicando uma ligeira acidez; $3,2\pm0,8$ para o atributo dureza que indicava o ótimo e $2,2\pm0,4$ para o atributo salgado, que indicava pouco salgado na opinião dos provadores. Esta couve ácida apresentava ainda a vantagem de ter sido preparada com um teor de sódio menor que o chouxcroute tradicional ($0,49\% < 1,15\%$).

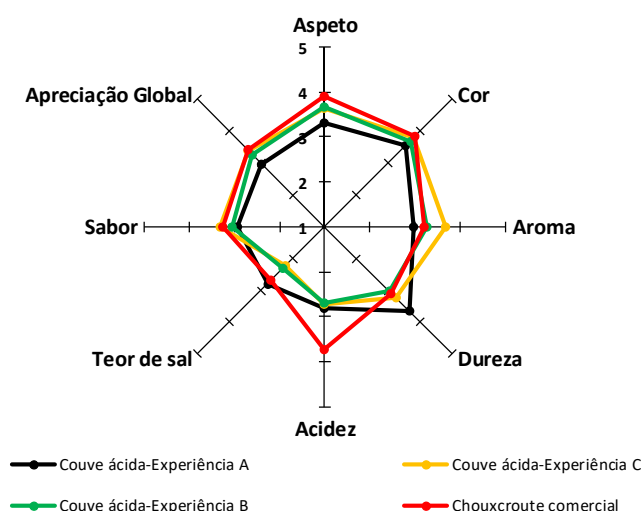


Figura 3.7 Avaliação organolética das couves ácidas fermentadas segundo as experiências A – ensaio controlo realizado com sal de mesa; B – ensaio realizado com salicórnia e C – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia e de chouxcroute comercial.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam os descritos por Wolkers-Rooijackers et al. (2013) que estudaram o efeito da redução de sal na avaliação sensorial de chouxcroute, obtido por fermentação de couve de acordo com três cenários diferentes (*A* - 15 g NaCl/kg, *B* - 9 g NaCl/kg e *C* - mistura de NaCl, KCl, MgCl₂ e CaCl₂ equivalente a 15 g NaCl/kg). Estes autores constataram que o chouxcroute da experiência *B*, com redução de 40% de NaCl foi a menos apreciada pelo painel de provadores relativamente à textura, ao sabor e ao aroma, provavelmente devido à baixa concentração de sal utilizada na fermentação. Observaram também que a textura do chouxcroute *C* obteve maior pontuação que os obtidos nas experiências *A* e *B*, o que lhes permitiu concluir que a mistura de sais resultava também numa sensação *crispy* no chouxcroute, conforme tinham obtido na experiência *A*.

3.2.3 Caracterização Nutricional

A couve fermentada mais apreciada pelo painel de provadores, tinha sido preparada com sal e salicórnia (ensaio *C* - 1,94% de sal equivalente) e foi caracterizada a nível da sua composição nutricional, tendo-se obtido os resultados indicados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Composição nutricional da couve ácida fermentada com sal e salicórnia - ensaio *C*; da couve fresca e da salicórnia (por 100 g, média \pm desvio padrão).

Composição Nutricional (100g)	Couve Ácida (ensaio <i>C</i>)	Couve	Salicórnia
Energia (kcal)	22 \pm 2	26,35 \pm 0,07	21,9 \pm 0,5
Água (g)	92,8 \pm 0,6	92,56 \pm 0,03	89,7 \pm 0,2
Proteína (g)	0,75 \pm 0,04	0,96 \pm 0,04	0,48 \pm 0,05
Hidratos de Carbono (g)	4,4 \pm 0,4	5,16 \pm 0,07	4,0 \pm 0,3
Lípidos (g)	0,053 \pm 0,004	0,056 \pm 0,001	0,07 \pm 0,005
Fibra (g)	0,68 \pm 0,07	0,68 \pm 0,05	1,51 \pm 0,01
Cinzas (g)	1,36 \pm 0,01	0,58 \pm 0,02	4,30 \pm 0,05

Comparando a composição nutricional da couve ácida obtida neste trabalho (ensaio *C*) com a composição nutricional do chouxcroute reportada pela National Nutrient Database for Standard References (USDA, 2017) pode-se dizer-se que apresentava teores água, proteína, lípidos e hidratos de carbono dentro dos valores reportados nesta base de dados de 92,47-92,52 g/100g, 0-0,91 g/100g, 0-0,20 g/100g e 3,14-4,28 g/100g, respetivamente, e, teores de fibra e cinzas ligeiramente menores que os valores referenciados 2,1-3,3 g/100g e 1,60-2,15 g/100g, respetivamente. O valor energético da couve ácida era ligeiramente maior que o referido pela base de dados (17-21 kcal/100g), porém, a diferença não tem significado estatístico. Os resultados obtidos permitem concluir que a couve fermentada com sal e salicórnia (ensaio *C*) apresentava-se nutricionalmente equilibrada e com uma composição semelhante ao chouxcroute comercializado referido pela base de dados. Ao comparar-se a composição nutricional da couve fermentada com a da couve fresca verificou-se que os teores de proteína e hidratos de carbono após a fermentação diminuíram, devido à sua difusão, hidrólise e metabolização durante a fermentação (Tabela 3.2). O teor em cinzas era

maior na couve ácida, porque foi preparada a partir de uma mistura de couve fresca e salicórnia que apresentava um teor em cinzas consideravelmente grande (Tabela 3.2).

3.3 Efeito da Adição de CaCl_2 na Fermentação e Qualidade da Couve Ácida

A couve ácida fermentada com sal e salicórnia (experiência C – 1,94% sal equivalente) foi considerada o melhor produto resultante dos três ensaios de fermentação realizados (experiências A, B e C), porém obteve uma avaliação menor que a couve ácida fermentada com sal de mesa (experiência A – 2,91% sal equivalente) no que respeita aos atributos dureza ($3,2 \pm 0,8 < 3,6 \pm 0,8$) e teor de sal ($2,2 \pm 0,4 < 2,8 \pm 0,8$). De acordo com Wolkers-Rooijackers, et al. (2013), a adição de CaCl_2 permite aumentar a dureza da couve fermentada, conferindo também um sabor mais salgado ao produto. Deste modo, foi estudado o efeito da adição de CaCl_2 ao preparado inicial de couve com sal de mesa e salicórnia, no perfil de fermentação e nas características físico-químicas, microbiológicas e organolépticas finais do produto obtido, com o propósito de aumentar ligeiramente a dureza e o teor de sal da couve fermentada. Realizaram-se os ensaios de fermentação, experiências A' (2,91% sal), C' (1,94% sal equivalente) e D (2,89% sal equivalente) conforme se apresentou na Tabela 2.1.

Seguindo a variação dos parâmetros pH e acidez do exsudado da couve nas experiências A', C' e D (Fig. 3.8) pode constatar-se a mesma tendência observada anteriormente (Fig. 3.1). Inicialmente, o pH diminuiu (até aos 2º-6º dia), mantendo-se depois praticamente constante até ao final da fermentação. Simultaneamente, a acidez aumentou atingindo-se um patamar por volta do 13º dia. No final da fermentação obtiveram-se valores de pH significativamente diferentes ($p < 0,05$) de $3,58 \pm 0,01$; $4,07 \pm 0,01$ e $3,78 \pm 0,01$ nos produtos D, C' e A', respetivamente e valores de acidez sem diferença estatística significativa de $0,77 \pm 0,01$; $0,70 \pm 0,01$ e $0,64 \pm 0,01$ g ácido láctico/100 ml nos produtos D, C' e A', respetivamente.

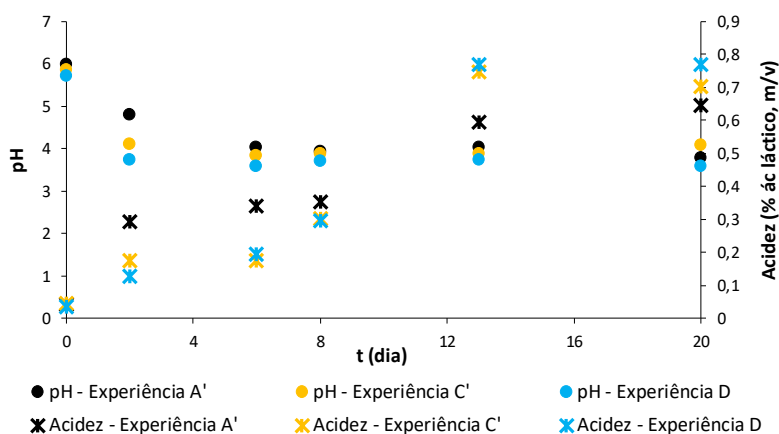


Figura 3.8 Variação do pH e da acidez do exsudado durante a fermentação de couve branca nas experiências: A' – ensaio controle realizado com sal de mesa; C' – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia; D – ensaio realizado com sal de mesa, salicórnia e CaCl_2 .

Quanto aos parâmetros da cor (Fig. 3.9), a luminosidade (L) da couve das experiências A' e C' evoluiu de forma semelhante ao observado anteriormente (Fig. 3.2), com uma ligeira tendência decrescente, mas a luminosidade de D manteve uma variação praticamente constante, apesar do

valor ter aumentado sem significância estatística de 46 ± 2 para $46,34 \pm 0,04$. A evolução do parâmetro a , ocorreu de acordo com o observado anteriormente, tendo aumentado ao longo da fermentação. Os valores medidos da couve fermentada D foram sempre mais baixos que os observados com as couves A' e C', o que indica que as cores esverdeadas da couve D mantiveram-se mais intensas que as outras (A e C). No final da fermentação a apresentava valores de $-0,1 \pm 0,5$; $1,1 \pm 0,7$ $0,2 \pm 0,2$ para as couves ácidas D, C' e A', respetivamente. Estatisticamente a couve ácida D não era significativamente diferente de A', mas era significativamente menor que C'. Relativamente à tonalidade da cor, h , a tendência decrescente foi igualmente observada para qualquer das experiências realizadas. No final da fermentação o valor de h era de 91 ± 3 ; 83 ± 5 ; 89 ± 1 para as experiências D, C' e A', respetivamente, havendo significância estatística entre a tonalidade da cor das couves ácidas D e C', o que significa que a presença de Ca confere uma tonalidade mais intensa à cor da couve.

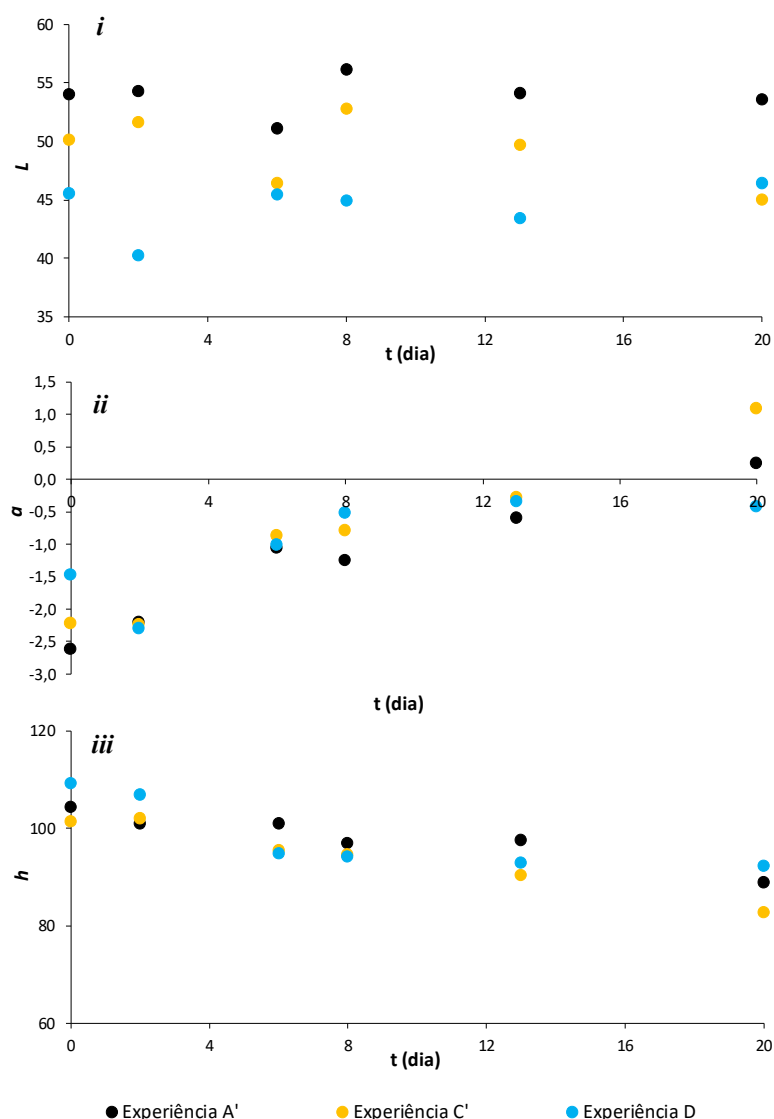


Figura 3.9 Variação dos parâmetros da cor, luminosidade L (3.9*i*), graduação da cor verde/vermelho a (3.9*ii*) e tonalidade h (3.9*iii*) durante a fermentação de couve branca nas experiências: A' – ensaio controlo realizado com sal de mesa; C' – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia; D – ensaio realizado com sal de mesa, salicórnia e CaCl_2 .

No que respeita à variação da microbiota ao longo da fermentação das couves das experiências A', C' e D, observaram-se tendências semelhantes (Figuras 3.10 e 3.11) às encontradas nas experiências A, B e C realizadas e descritas anteriormente (Figuras 3.3 e 3.4).

As populações de microrganismos aeróbios mesófilos e de BAL aumentaram até ao 6º dia de fermentação e depois diminuíram ligeiramente. No final da fermentação não se encontraram diferenças significativas entre as populações de microrganismos aeróbios mesófilos ($5,5 \pm 0,1$; $6,4 \pm 0,7$; $6,3 \pm 0,8$ Log UFC/g) ou BAL ($5,5 \pm 0,2$; 6 ± 1 ; $5,5 \pm 0,1$ Log UFC/g) das couves ácidas das experiências A', C' e D, respetivamente.

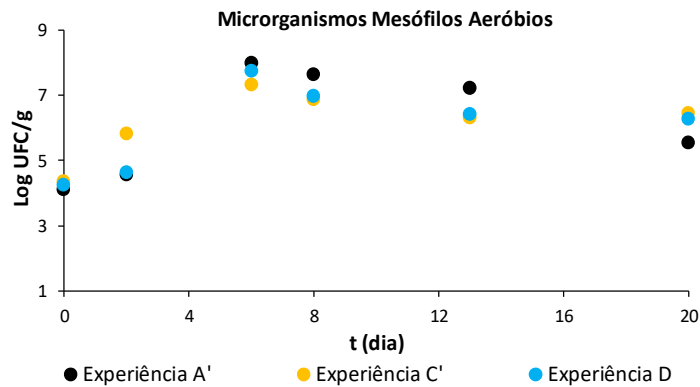


Figura 3.10 Variação da população de microrganismos mesófilos aeróbios durante a fermentação de couve branca nas experiências: A' – ensaio controlo realizado com sal de mesa; C' – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia; D – ensaio realizado com sal de mesa, salicórnia e CaCl_2 .

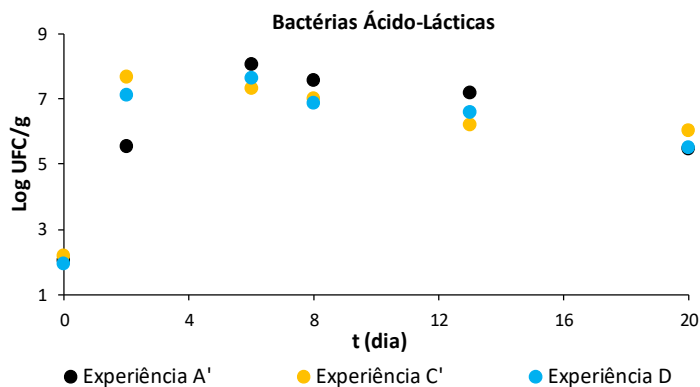


Figura 3.11 Variação da população de bactérias ácido-láticas durante a fermentação de couve branca nas experiências: A' – ensaio controlo realizado com sal de mesa; C' – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia; D – ensaio realizado com sal de mesa, salicórnia e CaCl_2 .

Os números de unidades formadoras de colónias de fungos filamentosos e leveduras e de coliformes totais também diminuíu (Figuras 3.12 e 3.13) tal como nos resultados obtidos anteriormente (Figuras 3.5 e 3.6). Ao fim do 6º dia de fermentação deixaram de se detetar colónias de fungos e após 8 a 13 dias não se detetaram coliformes totais.

Foram também analisadas amostras das couves ácidas A', C' e D no que respeita à presença de *Staphylococcus* coagulase positivos, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. e os resultados confirmaram ausência destes microrganismos em todas as couves ácidas fermentadas obtidas.

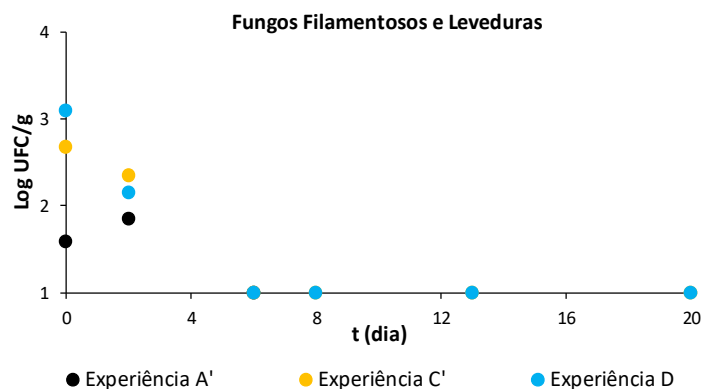


Figura 3.12 Variação da população de fungos filamentosos e leveduras durante a fermentação de couve branca nas experiências: A' – ensaio controlo realizado com sal de mesa; C' – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia; D – ensaio realizado com sal de mesa, salicórnia e CaCl_2 .

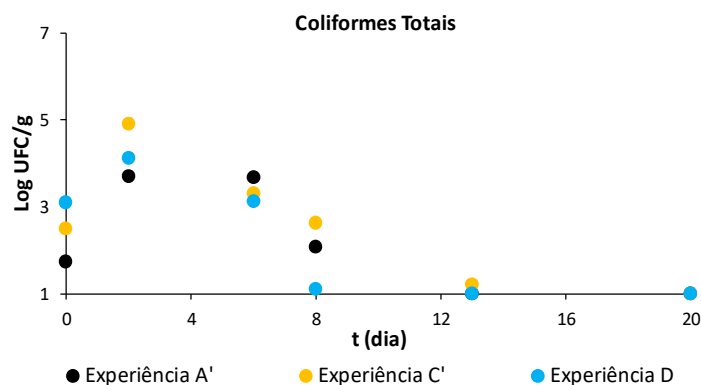


Figura 3.13 Variação da população de coliformes totais durante a fermentação de couve branca nas experiências: A' – ensaio controlo realizado com sal de mesa; C' – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia; D – ensaio realizado com sal de mesa, salicórnia e CaCl_2 .

Após fermentação durante 20 dias, o produto final, couve ácida fermentada ou exsudado obtido na experiência D (fermentado com sal, salicórnia e CaCl_2) foi caracterizado fisico-quimicamente (atividade da água, salinidade, sólidos solúveis totais, dureza e trabalho realizado na compressão) e comparado com os produtos resultantes das experiências A' (couve fermentada com sal) e C' (couve fermentada com sal e salicórnia). Os resultados obtidos apresentam-se seguidamente na Tabela 3.3.

A adição de CaCl_2 aumentou a salinidade, pois a couve ácida D era significativamente mais salgada que a C', mas significativamente menos salgada que a A' ($p < 0,05$) (Tabela 3.3). Tal como se tinha descrito anteriormente (Tabela 3.1) ocorreu um aumento de salinidade com a fermentação. Comparando com a experiência C', a adição do CaCl_2 (experiência D) traduziu-se num aumento da % de sal equivalente ($2,93\% > 1,94\%$) e, por conseguinte, num aumento da salinidade tanto do preparado inicial como do produto final obtido. A salinidade da couve da experiência D revelou-se superior à da experiência C', devido à adição de CaCl_2 , porém inferior à da experiência A', porque apesar da maior concentração de sal equivalente em D que em A' ($2,91\%$) a incorporação de salicórnia faz com que parte dos sais se concentrem na polpa e fiquem menos disponíveis.

A a_w não variou significativamente com a fermentação, nem se mostrou ser estatisticamente significativa a diferença entre os valores de a_w das couves ácidas A', C' e D (Tabela 3.3).

Conforme se tinha descrito anteriormente nas experiências de fermentação de couve A, B e C (Tabela 3.1), constatou-se um aumento significativo do teor de SST com a fermentação de couve nas três experiências realizadas A', C' e D ($p < 0,05$) (Tabela 3.3). Este aumento é devido à solubilização e à difusão de compostos, de entre os quais os açúcares, das folhas de couve e da salicórnia para o exsudado, sendo depois metabolizados pelas BAL. A concentração de SST da experiência D, no final da fermentação, foi significativamente maior que a da experiência C', mas significativamente menor que a da experiência A' (Tabela 3.3), podendo justificar-se também pelo facto de que na experiência A', todo o sal se tratava de sal de mesa adicionado, e nas experiências D e C', a grande parte era sal equivalente, isto é sal que tinha sido adicionado sob a forma de minerais oriundos da salicórnia e, em particular, do CaCl_2 adicionado na experiência D.

A dureza das couves ácidas aumentou com a fermentação (Tabela 3.3), conforme se tinha observado anteriormente (Tabela 3.1). A couve da experiência D tornou-se significativamente mais dura que a da experiência C' ($p < 0,05$) e mais dura que a da experiência A', mas sem significado estatístico (Tabela 3.3). Este facto deve-se à adição de CaCl_2 , pois segundo Buesher & Hudson (1986) e McFeeters & Fleming (1990), o Ca contribui para manter a firmeza do vegetal a baixos valores pH através da sua ligação aos polissacarídeos das paredes celulares. O trabalho realizado na compressão da couve na experiência D, tanto no início como no final da fermentação era significativamente superior ao encontrado nas couves das experiências A' e C' (Tabela 3.3), dando indicação de que a adição de Ca aumentou a dureza do produto final da experiência D, conforme se esperava. De acordo com Thompson, Fleming & Monroe (1979), Hudson & Bluescher (1980) e Tang & McFeeters (1983), a utilização do CaCl_2 na salmoura de fermentação de pepinos é uma prática comum que remonta há mais de 30 anos com o objetivo de se manter a textura crocante (*crispy*) destes vegetais fermentados.

Tabela 3.3 Características físico-químicas da couve ácida obtida por fermentação segundo os ensaios A' – ensaio controlo realizado com sal de mesa (2,91% sal equivalente); C' – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia (1,94% sal equivalente); D – ensaio realizado com sal de mesa, salicórnia e CaCl_2 (2,89% sal equivalente).

Parâmetros	Ensaio A'		Ensaio C'		Ensaio D	
	Início	Final	Início	Final	Início	Final
Salinidade	5,78±0,08 ^d	8,51±0,01 ^f	3,86±0,04 ^a	4,68±0,08 ^b	5,11±0,01 ^c	6,24±0,04 ^e
a_w	0,948±0,001 ^a	0,946±0,001 ^a	0,959±0,001 ^a	0,8±0,2 ^a	0,960±0,001 ^a	0,961±0,001 ^a
SST	6,90±0,01 ^d	9,59±0,01 ^f	4,54±0,04 ^a	5,62±0,04 ^b	5,79±0,01 ^c	7,08±0,03 ^e
Dureza (N)	3,3±0,4 ^{a,b}	4,7±0,4 ^{b,c}	2,7±0,5 ^a	4,4±0,7 ^{a,b}	4,3±0,1 ^{a,b}	6,3±0,1 ^c
Trabalho (mN.m)	5,7±0,7 ^a	8±1 ^{a,b}	7,0±1,0 ^{a,b}	10±2 ^{b,c}	12,2±0,1 ^c	21±3 ^d

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Scheffe ($p < 0,05$)

McFeeters & Pérez-Díaz (2010) realizaram um estudo sobre a fermentação de pepinos em salmouras de CaCl_2 em substituição de NaCl , com o objetivo de estudar a evolução da fermentação na ausência

de NaCl e comparar a textura dos produtos fermentados obtidos. Neste estudo, os autores realizaram 3 fermentações com concentrações diferentes de CaCl_2 (100, 200 e 300 mM) e uma fermentação controle (1,03 M NaCl e 40 mM CaCl_2) e concluíram que é possível fermentar pepinos apenas com CaCl_2 (sem NaCl), pois nos produtos finais se tinham obtido concentrações elevadas de ácido láctico, baixo pH e baixo ou nenhum açúcar residual, mantendo-se para além disso, a firmeza dos pepinos fermentados. Porém, estes autores, referem que uma elevada concentração de CaCl_2 conferia um sabor a giz (*chalky flavor*) aos vegetais fermentados, não devendo por isso ser utilizada uma concentração de CaCl_2 superior a 25 mM.

A couve ácida produzida na presença de cálcio, experiência D, foi também avaliada sensorialmente em conjunto com as couves ácidas das experiências A' e C' e com o chouxcroute comercial (Fig. 3.14). O painel de provadores não detetou diferenças significativas nos atributos sensoriais entre os produtos analisados ($p < 0,05$). As três couves ácidas, A', C' e D, e o chouxcroute comercial foram classificadas com valores semelhantes em todos os atributos, sabor ($2,5 \pm 0,9$; $3,2 \pm 0,8$; $2,5 \pm 0,9$ e $3,1 \pm 0,9$, respetivamente), apreciação global ($2,7 \pm 0,9$; $3,2 \pm 0,8$; $2,5 \pm 0,9$ e $3,4 \pm 0,8$, respetivamente), aspeto ($3,3 \pm 0,9$; $3,8 \pm 0,9$; $3,4 \pm 0,9$ e $3,9 \pm 0,9$, respetivamente), cor ($3,1 \pm 0,9$; $3,9 \pm 0,8$; $3,5 \pm 0,9$ e $3,9 \pm 0,7$, respetivamente), aroma ($3,1 \pm 0,8$; $3,3 \pm 0,7$; $3,0 \pm 0,7$ e $3,6 \pm 0,9$, respetivamente), acidez ($2,8 \pm 0,8$; $2,9 \pm 0,9$; 3 ± 1 e $3,6 \pm 0,8$, respetivamente), dureza ($3,7 \pm 0,9$; $3,3 \pm 0,9$; $3,7 \pm 0,9$ e $3,4 \pm 0,9$, respetivamente) e teor de sal (3 ± 1 ; $2,8 \pm 0,6$; $2,6 \pm 0,8$ e $2,7 \pm 0,9$, respetivamente). Apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas pode-se dizer que a couve ácida da experiência D é a mais dura de todas as couves ácidas produzidas, conforme tinha sido objetivo deste estudo.

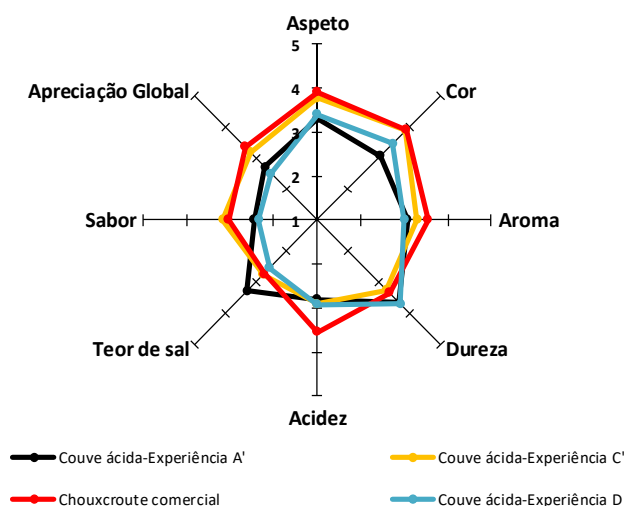


Figura 3.14 Avaliação organolética das couves ácidas fermentadas segundo as experiências A' – ensaio controlo realizado com sal de mesa; C' – ensaio realizado com sal de mesa e salicórnia; D - ensaio realizado com sal de mesa, salicórnia e CaCl_2 e de chouxcroute comercial.

Alguns dos resultados obtidos no capítulo 3.1 foram apresentados numa comunicação sob a forma de painel intitulada “Fermentation of *Brassica oleracea* L. with the halophyte plant *Salicornia ramosissima*L.” (Book of Abstracts, #226, p. 278) no 5th International ISEKI_Food Conference em Estugarda (3-5/2018) (Anexo II).

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho estudou-se o efeito da utilização de *Salicornia ramosissima* como substituto total ou parcial do NaCl na fermentação de couve branca (*Brassica oleracea*) e caracterizaram-se os produtos fermentados obtidos no que diz respeito às suas propriedades físico-químicas, organolépticas, nutricionais e de segurança alimentar. Os processos fermentativos foram acompanhados experimentalmente através do estudo de alguns parâmetros físico-químicos e microbiológicos, tendo-se realizado com sucesso as seguintes fermentações: experiências A ou A' (ensaios controlo) de fermentação de couve com 2,91% de sal de mesa (~1,1% Na); experiências B de fermentação de couve com salicórnia (~1,56% de sal equivalente, ~0,34% Na); experiências C ou C' de fermentação de couve com sal de mesa e salicórnia (~1,94% de sal equivalente, ~0,49% Na); e experiências D de fermentação de couve com sal de mesa, salicórnia e CaCl_2 (~2,89% de sal equivalente, ~0,48Na).

Durante a fermentação a couve acidificou, observando-se uma diminuição do pH para valores inferiores a 4 e um aumento da acidez até aproximadamente 1,0%. As populações de microrganismos mesófilos aeróbios e de BAL aumentaram e estabilizaram em 5,5-7,2 Log UFC/g e 5,4-6,6 Log UFC/g, respetivamente, ao passo que as populações de fungos e de coliformes diminuíram para níveis inferiores ao limite de deteção das técnicas, não se tendo detectado *Escherichia coli* e *Salmonella* sp., o que garante a higiene e segurança microbiológica dos alimentos fermentados obtidos. A fermentação resultou em produtos finais com uma concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante superior aos das matérias-primas.

A análise sensorial das couves ácidas A, B e C mostrou que havia apenas diferenças significativas entre as amostras no que respeita aos atributos dureza e teor de sal, sendo a couve A a mais salgada e a de maior dureza, a couve B a de menor dureza e a couve C a menos salgada, mas a de melhor classificação atribuída pelo painel de provadores. Estes resultados permitem concluir que se pode produzir com sucesso uma couve ácida sem adição de sal de mesa, utilizando apenas salicórnia. Contudo, uma combinação de sal e salicórnia permite obter um produto fermentado mais apreciado pelos provadores (Couve ácida C). Este produto apresenta características nutricionais semelhantes às do chouxcroute comercial, e ainda uma redução de ~50% de Na.

A adição de CaCl_2 à couve com sal e salicórnia é uma boa solução para aumentar a dureza da couve ácida.

Pode-se concluir que é possível fermentar couve branca com salicórnia como substituto parcial do sal e obter uma couve ácida com características físico-químicas, microbiológicas, nutricionais e sensoriais semelhantes às do chouxcroute comercial, apresentando a vantagem de ter um conteúdo de Na consideravelmente menor.

5. PERSPETIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Concluído o trabalho experimental e analisados os resultados, surgem algumas questões, nomeadamente a aplicação do conhecimento desenvolvido na produção a nível industrial desta couve fermentada com uma combinação de sal e salicórnia, assim como o estudo da sua conservação durante o período de armazenamento e comercialização. Seria, por isso, interessante prosseguir este trabalho com vista a acrescentar-lhe mais valias, propondo-se evoluir futuramente nas seguintes linhas de investigação:

- Realizar um *scale-up* à escala piloto de fermentação da couve branca, com vista à produção de uma couve ácida com menor teor de sódio que o choucroute tradicional, utilizando sal, salicórnia e CaCl_2 .
- Aplicar tratamentos de pasteurização, utilizando binários de tempo-temperatura diferentes, e estudar os seus efeitos nas características físico-químicas, nutricionais e organoléticas e de segurança alimentar da couve ácida obtida.
- Realizar um estudo de tempo de vida útil (tempo de prateleira), avaliando a qualidade do produto.
- Estudar o efeito da utilização de diferentes misturas de sais minerais e/ou plantas halófitas edíveis na fermentação da couve branca como substitutos totais ou parciais do NaCl .
- Estudar a composição dos consórcios microbianos associados à produção deste alimento fermentado com o objetivo de desenvolver um *starter* adequado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aberoumand, A., & Deokule, S.S. (2009). Determination of elements profile of some wild edible plants. *Food Analytical Methods*, 2, 116-119.
- Adams, M.R. (1990). Tropical aspects of fermented foods. *Trends in Food Science & Technology*, 1, 140-144.
- Adams, M.R., Moss, M.O., McClure, P. (2016). Food Microbiology (4th ed.). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- AOAC (1990a). *Official Methods of Analysis*. Official method 934.01. (15th ed.). Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC (1990b). *Official Methods of Analysis*. Official method 920.152. Kjeldahl Method. (15th ed.). Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC (1990c). *Official Methods of Analysis*. Official method 940.26. (15th ed.). Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC (2000). *Official Methods of Analysis*. Official method 948.22. (17th ed.). Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC (2005). *Official Methods of Analysis*. Official method 978.10. (18th ed.). Gaithersburg, MD, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Ayaz, F.A., Hayirhoglu-Ayaz, S., Alpay-Karaoglu, S., Grúz, J., Valentová, K., Ulrichova, J., et al. (2008). Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chemistry*, 107, 19-25.
- Bay, Y., Findlay, B., Sanchez Maldonado, A.F., Schieber, A., Vederas, J.C., & Gänzle, M.G. (2014). Novel pyrano and vinylphenol adducts of deoxyanthocyanidins in sorghum sourdough. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 11536-11546.
- Barceló-Coblijn, G., & Murphy, E.J. (2009). Alpha-linoleic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Progress in Lipid Research*, 48, 355-374.
- Barth, M., Hankinson, T.R., Zhuang, H., Breid, F., & Breidt, F. (2009). Microbiological spoilage of fruit and vegetables. In: W.H. Sperber (Ed.). *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*. (pp. 135-183). New York: C Springer Science and Business Media.
- Barreira, L., Resek, E., Rodrigues, M.J., Rocha, M.I., Pereira, H., Bandarra, N., et al. (2017). Halophytes: Gourmet food with nutritional health benefits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 35-42.
- Beecher, C.W. (1994). Cancer preventive properties of varieties of *Brassica oleracea*. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 59, 1166-1170.
- Becerra-Tomas, N., Guasch-Ferre, M., Quilez, J., Merino, J., Ferre, R., Diaz-Lopez, A., et al. (2015). Effect of functional bread rich in potassium, gamma-aminobutyric acid and angiotensin-converting enzyme inhibitors on blood pressure, glucose metabolism and endothelial function: a double-blind randomized crossover clinical trial. *Medicine (Baltimore)*, 94(46): e1807.
- Björkman, M., Klingen, I., Birch, A.N.E., Bones, A.M., Bruce, T.J.A., Johansen, T.J., et al. (2011). Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health – influences of climate, environment and agronomic practice. *Phytochemistry*, 72, 538-556.
- Bongoni, R., Verkerk, R., Steenbekkers, B., Dekker, M., & Sieger, M. (2014). Evaluation of different cooking conditions on broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) to improve the nutritional value and consumer acceptance. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(3), 228-234.
- Boskou, G., Salta, F., Chrysostomou, S., Mylona, A., Chiou, A., & Andrikopoulos, N.K. (2006). Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry*, 94, 558-564.

- Cabello-Hurtado, F., Gicquel, M., & Esnault, M.A. (2012). Evaluation of the antioxidant potencial of cauliflower (*Brassica oleracea*) from a glucosinolate content prespective. *Food Chemistry*, 132, 1003-1009.
- Caetano, M., Vale, C., Cesário, R., & Fonseca, N. (2008). Evidence for preferential depths of metal retention in roots of salt marsh plants. *Science of the Total Environment*, 390, 466-474.
- Ciska, E., & Pathak, D. (2004). Glucosinolate derivatives in stored fermented cabbage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 7938-7943.
- Corzo, N., Alonso, J.L., Azpiroz, F., Calvo, M.A., Cirici, M., Leis, R., et al. (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 99-118.
- Cruz, R.M.S., Godinho, A.I.A., Dilek, A., Necip, F.K., & Vieira, M.C. (2016). Modeling the kinetics of peroxidase inactivation, colour and texture changes of Portuguese cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) during UV-C light and heat blanching. *International Journal of Food Studies*, 5, 180-192.
- Desai, P.D., Dave, A.M., & Devi, S. (2006). Alcoholysis of Salicornia oil and covalently bound lipase onto chitosan beads. *Food Chemistry*, 95, 193-199.
- Dinkova-Kostova, A.T., & Kostov, R.V. (2012). Glucosinalates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 18, 337-347.
- Duthie, G.G., Duthie, S.J., & Kyle, J.A.M. (2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutrional antioxidants. *Nutrition Research Reviews*, 13, 79-106.
- Etchells, J.L., Bell, T.A., Monroe, R.J., Masley, P.M., & Demain, A.L. (1958). Populations and softening enzyme activity of filamentous fungi on flowers, ovaries, and fruit of pickling cucumbers. *Applied Microbiology*, 6(6), 427-440.
- European Commission (EC), (2005). Regulation 2073/2005. EU Official Journal, 15/11/2005, L.338, p.1-26.
- European Commission (EC). (2008). Directive 2008/100/EC of 28 October 2008 amending Council Directive 90/496/EEC on nutrition labelling for foodstuffs as regards recommended daily allowances, energy conversion factors and definitions. Annex II. *Official Journal of the European Union L*, 285, 9-12.
- Ferreira, D., Isca, V.M.S., Leal, P., Seca, A.M.L., Silva, H., Pereira, M.L., et al. (2016). *Salicornia ramosissima*: Secondary metabolits and protective effect against acute testicular toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(1), 70-80.
- Fowke, J.H., Longeope, C., & Hebert, J. (2000). *Brassica* vegetable consumption shifts estrogen metabolism in healthy postmenopausal women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 9, 773-779.
- Fowke, J.H., Chung, F.L., Jin, F., Qi, D., Cai, Q., Conaway, C., et al. (2003). Urinary isothiocyanate levels, *Brassica*, and human breast cancer. *Cancer Research*, 63, 3980-3986.
- Gagné, M.J., Barrette, J., Savard, T., & Brassard, J. (2015). Evaluation of survival of murine norovirus-1 during sauerkraut fermentation and storage under standard and low-sodium conditions. *Food Microbiology*, 52, 119-123.
- Gargouri, M., Magné, C., Dauvergne, X., Ksouri, R., El Feki, A., Metges, M.A.G., et al. (2013). Cytoprotective and antioxidant effects of the edible halophyte *Sarcocornia perennis* L. (swampfire) against lead-induced toxicity in renal cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95, 44-51.
- Ghosh, D., & Konishi, T. (2007). Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16, 200-208.
- González, R.D., Tamagnini, L.M., Olmos, P.D., & Sousa, G.B. (2003). Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods. *Food Microbiology*, 20, 601-604.

Gould, S., Tkesslee, D.K., & King, C.G. (2006). Vitamin-C content of vegetables, V. Cabbage. *Journal Food Science*, 1(5), 427-434.

Graça, P. (2013). Relatório. Estratégia para a redução do consumo de sal na alimentação em Portugal. Direção Geral de Saúde. Ministério de Saúde, 1-27.

Guil, J.L., Torija, M.E., Giménez, J.J., & Rodriguez, I. (1996). Identification of fatty acids in edible wild plants by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 719, 229-235.

Hill, D., Sugrue, I., Arendt, E., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R.P. (2017). Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. *Food Research*, 6, 751.

Hong, Y.F., Lee, H., Jung, B.J., Jang, S., Chung, D.K., & Kim, H. (2015). Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* down-regulates UV-induced MMP-1 expression and up-regulates type I procollagen through the inhibition of reactive oxygen species generation. *Molecular Immunology*, 67, 248-255.

Hung, H., Joshipura, K.J., Jiang, R., Hu, F.B., Hunter, D., & Smith-Warner, S.A., et al. (2004). Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(21), 1577-1584.

Hudson, J.M., & Buescher, R.W. (1980). Prevention of soft center development in large whole cucumber pickles by calcium. *Journal Food Science*, 45(5), 1450-1451.

Hutkins, R.W. (2006). Fermented Vegetables. In: R.W. Hutkins, *Microbiology and Technology of Fermented Foods* (1^a ed.). (pp. 233-259). Iowa: Blackwell Publishing.

INSA (2018). Tabela da Composição de Alimentos. Consultado em 14 de janeiro, 2018 através de <http://portfir.insa.pt/foodcomp/food?673>

Isca, V.M.S. (2013). *Salicornia ramosissima* J. Woods: Estudo fitoquímico das partes aéreas. (Dissertação de Mestrado). Aveiro: Universidade de Aveiro.

Isca, V.M.S., Seca, A.M.L., Pinto, D.C.G.A., Silva, H., & Silva A. (2014). Lipophilic profile of the edible halophyte *Salicornia ramosissima*. *Food Chemistry*, 165, 330-336.

ISO 15214 (British Standard) (1998). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count at 30 °C.

ISO 16649-2 (2001). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide.

ISO 6579 (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection of *Salmonella* spp..

ISO 6888-1 (1999) Amd 1: (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium Amendment 1: Inclusion of precision data.

ISO 21527-2 (2008). Microbiology – General guidance for enumeration of yeasts and molds. Colony count technique at 25 °C.

ISO 4833-1 (2013). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for enumeration of microorganisms – Colony-count at 30 °C.

Jahgangir, M.J., Kim, H.K., Choi, Y.H., & Verpoorte, R. (2009). Health-affecting compounds in *Brassicaceae*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 31-43.

Jaiswal, A.K., Raiauria, G., Abu-Ghannam, N., & Gupta, S. (2011). Phenolic composition, antioxidante capacity and antibacterial activity of Brassica vegetables. *Natural Product Communication*, 6, 1299-1304.

Johanningsmeier, S., McFeeters, R.F., Fleming, H.P., & Thomson, R.L. (2007). Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter culture on fermentation of cabbage with reduced salt concentrations. *Journal of Food Science*, 72(5), M166-M172.

Julião, M.R.A. (2013). *Avaliação do Potencial da Salicornia ramosissima para Saladas Frescas ou em Pó (Sal Verde)*. (Disertação de Mestrado). Faro: Universidade do Algarve (UAlg).

Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 209-224.

Kaur, C., & Kapoor, H.C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36(7), 703-725.

Katz, S.E. (2003). Vegetable Ferments. In: S.E. Katz, *Wild Fermentation: the flavor, nutrition, and craft of live-culture foods* (1^a ed.). (pp. 38-56). Vermont: Chelsea Green.

Kim, D.H., Song, H.P., Yook, H.S., Ryu, Y.G., & Byun, M.W. (2004). Isolation of enteric pathogens in the fermentation process of Kimchi (Korean fermented vegetables) and its radication by gamma irradiation. *Food Control*, 15, 441-445.

Kusznierewicz, B., Bartoszek, A., Wolska, L., Drzewiecki, J., Gorinstein, S., & Namieśnik, J. (2008). Partial characterization of white cabbages (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) from different regions by glucosinolates, bioactive compounds, total antioxidant activities and proteins. *LWT – Food Science and Technology*, 41(1), 1-9.

Lee, I.S., Boyce, M.C., & Breadmore, M.C. (2011). A rapid quantitative determination of phenolic acids in *Brassica oleracea* by capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry*, 127, 797-801.

Leite, A.V., Malta, L.G., Riccio, M.F., Eberlin, M.N., Pastore, G.M., & Maróstica Júnior, M.R. (2011). Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2277-2283.

Li, W., Ji, J., Chen, X., Jiang, M., Rui, X., & Dong, M. (2014). Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydrate Polymers*, 102, 351-359.

Li, X.F., Ning, Y.W., Liu, D., Yan, A.H., Wang, Z.X., Wang, S.J., et al. (2015). Metabolic mechanism of phenyllactic acid naturally occurring in Chinese pickles. *Food Chemistry*, 186, 265-270.

Lopes, A., Rodrigues, M.J., Pereira, C., Oliveira, M., Barreira, L., Varela, J., et al. (2016). Natural products from extreme marine environments: Searching for potential industrial uses within extremophile plants. *Industrial Crops and Products*, 94, 299-307.

Lu, D., Zhang, M., Wang, S., Cai, J., Zhou, X., & Zhu, C. (2010). Nutritional characterization and changes in quality of *Salicornia bigelovii* Torr during storage. *LWT. Food Science and Technology*, 43, 519-524.

Luthria, D.L., & Mukhopadhyay, S. (2006). Influence of sample preparation on assay of phenolic acids from eggplant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 41-47.

Marco, M.L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C.J., Cotter, P.D., Foligné, B., et al. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Science Direct*, 44, 94-102.

Mateus, T., Santo, D., Saúde, C., Pires-Cabral, P., & Quintas, C. (2018). The effect of NaCl reduction in the microbiological quality of cracked green table olives of the Maçanilha Algarvia cultivar. *International Journal of Food Microbiology*, 57-65.

Mattila, P., & Hellstrom, J. (2007). Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 152-160.

Martinez-Villaluenga, C., Peñas, E., Frias, J., Ciska, E., Honke, J., Piskula, M.K., et al. (2009). Influence of fermentation conditions on glucosinolates, ascorbigen, and ascorbic acid content in white

cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. Taler) cultivated in different seasons. *Journal of Food Science*, 74, C62-C67.

McFeeters, R.F., & Pérez-Díaz, I. (2010). Fermentation of cucumbers brined with calcium chloride instead of sodium chloride. *Journal of Food Science*, 75, C291-C296.

Motarjemi, Y. (2002). Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75(3), 213-229.

Ness, A.R., & Powles, J.W. (1997). Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *International Journal of Epidemiology*, 26, 1-13.

Nilsson, J., Olsson, K., Engqvist, G., Ekvall, J., Olsson, M., Nyman M., et al. (2006). Variation in the content of glucosinolates, hydroxycinnamic acids, carotenoids, total antioxidant capacity and low-molecular-weight carbohydrates in *Brassica* vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 528-538.

Nout, M.J.R., & Rombouts, F.M. (2000). Fermented and acidified plant foods. In: B.M. Lund, T.C., Baird-Parker, & G.W. Gould (Eds.). *The microbiological safety and quality of food*. (pp. 685-737). Gaithersburg, USA: Aspen Publishers.

Organização Mundial de Saúde (OMS) (2013). *Salt Reduction*. Consultado em 14 de janeiro, 2018 através de <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salt-reduction>

Organização Mundial de Saúde (OMS) (2016). *Salt Reduction*. Consultado em 14 de janeiro, 2018 através de <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salt-reduction>

Park, S., Arasu, M.V., Lee, M.-K., Chun, J.-H., Seo, J.-M., Al-Dhabi, N.A., et al. (2014a). Quantification of glucosinolates, anthocyanins, free amino acids, and vitamin C in inbred lines of cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Food Chemistry*, 145, 77-85.

Park, S., Arasu, M.V., Lee, M.-K., Chun, J.-H., Seo, J.-M., Al-Dhabi, N.A., et al. (2014b). Analysis and metabolite profiling of glucosinolates, anthocyanins and free amino acids in inbred lines of green and red cabbage (*Brassica oleracea* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), 203-213.

Patra, J.K., Das, G., Paramithiotis, S., & Shin, H.S. (2016). Kimchi and Other Widely Consumed Traditional Fermented Foods of Korea: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1493.

Pawlowska, A.M., Zannini, E., Coffey, A., & Arendt, E.K. (2012). "Green preservatives": combating fungi in the food and feed industry by applying antifungal lactic acid bacteria. *Advances in Food and Nutrition Research*, 66, 217-238.

Peñas, E., Frias, J., Sidro, B., & Vidal-Valverde, C. (2010a). Chemical evaluation and sensory quality of sauerkrauts obtained by natural and induced fermentations at different NaCl levels from *Brassica oleracea* L. var. *capitata* cv. Bronco grown in eastern Spain. Effect of storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3549-3557.

Peñas, E., Frias, J., Sidro, B., & Vidal-Valverde, C. (2010b). Impact of fermentation conditions and refrigerated storage on microbial quality and biogenic amine content of sauerkraut. *Food Chemistry*, 123, 143-150.

Peñas, E., Pihlava, J.-M., Vidal-Valverde, C., & Frias, J. (2012a). Influence of fermentation conditions of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* on the volatile glucosinolate hydrolysis compounds of sauerkrauts. *LWT – Food Science and Technology*, 48, 16-23.

Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., Sánchez-Martínez, M.J., Pérez-Corona, M.T., Madrid, Y., et al. (2012b). Se improves indole glucosinolate hydrolysis products content, S-methylselenocysteine content, antioxidant capacity and potential anti-inflammatory properties of sauerkraut. *Food Chemistry*, 132, 907-914.

Plengvidhya, V., Breidt, F., Lu, Z., & Fleming, H.P. (2007). DNA Fingerprinting of Lactic Acid Bacteria in Sauerkraut Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(23), 7697-7702.

- Radwan, H.M., Nazif, N.M., & Abou-Setta, L.M. (2007). Phytochemical investigation of *Salicornia fruticosa* (L.) and their biological activity. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2, 72-78.
- Reyes, L.F., Villareal, J.E., & Cisneros-Zevallos, L. (2007). The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. *Food Chemistry*, 101, 1254-1264.
- Rice-Evans, C.A., & Packer, L. (2003). Flavonoids in health and disease. (pp. 467-469). New York: Marcel Dekker.
- Roy, M.K., Takenaka, M., Isobe, S., & Tsushida T. (2007). Antioxidant potential, antiproliferative activities, and phenolic content in water-soluble fractions of some commonly consumed vegetables: effects of thermal treatment. *Food Chemistry*, 103, 106-114.
- Saúde, C., Barros, T., Mateus, T., Quintas, C., & Pires-Cabral, P. (2017). Effect of chloride salts on the sensory and nutritional properties of cracked table olives of the Maçanilha Algarvia cultivar. *Food Bioscience*, 19, 73-79.
- Šamec, D., Piljac-Zegarac, J., Bogović, M., Habjanič, K. & Grúz, J. (2011). Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) and Chinese (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis* (Lour.)) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. *Scientia Horticulturae*, 128(2), 78–83.
- Senger, D.R., Li, D., Jaminet, S.C., & Cao, S. (2016). Activation of the Nrf2 cell defense pathway by ancient foods: disease prevention by important molecules and microbes lost from the modern western diet. *PLOS ONE*, 11(2): e0148042.
- Septembre-Malaterre, A., Remize, F., & Poucheret, P. (2018). Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Research International*, 104, 86-99.
- Simopoulos, A.P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 233, 674-678.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology*, 299, 152-178.
- Song, I., & Thornalley, P.J. (2007). Effects of storage, processing and cooking on glucosinolate content of *Brassica* vegetables. *Food Chemical Toxicology*, 45, 216-224.
- Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., & Sinderen, D.V. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current opinion in Biotechnology*, 16(2), 198-203.
- Swain, M.R., Anandharaj, M., Ray, R.C., & Rani, R.P. (2014). Fermented Fruits and Vegetables of Asia: A Potential Source of Probiotics. *Biotechnology Research International*. ID 250424. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/250424>
- Tamang, J.P., Shin, D.H., Jung, S.J., & Chae, S.W. (2016). Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. *Frontiers in Microbiology*, 7, 578.
- Tang, H.C.L., & McFeeters, R.F. (1983). Relationships among cell wall constituents, calcium and texture during cucumber fermentation and storage. *Journal of Food Science*, 48(1), 66–70.
- Terán, L.C., Coeuret, G., Raya, R., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M.C., & Chailou, S. (2018). Phylogenomic Analysis of *Lactobacillus curvatus* Reveals Two Lineages Distinguished by Genes for Fermenting Plant-Derived Carbohydrates. *Genome Biology and Evolution*, 10(6), 1516-1525.
- Threapleton, D.E., Greenwood, D.C., Evans, C-E-L., Cleghorn, C.L., Nykjaer, C., Woodhead, C., et al. (2013). Dietary fibre intake and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *British Medical Journal*, 347, f6879.

- Tijsskens, L., Schijvens, E., & Biekman, E. (2001). Modelling in the change in colour of broccoli and green beans during blanching. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(4), 303-313.
- Thompson, R.L., Fleming, H.P., Monroe, R.J. (1979). Effects of storage conditions on firmness of brined cucumbers. *Journal of Food Science*, 44(3), 843–846.
- United States Department of Agriculture (USDA). (2017). National Nutrient Database for Standard Reference. Full Report 11439. Consultado em 14 de janeiro, 2018 através de <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/11439>
- Viander, B., Maki, M., & Palva, A. (2003). Impact of low salt concentration, salt quality on natural large-scale sauerkraut fermentation. *Food Microbiology*, 20, 391-395.
- Xiong, T., Guan, Q.Q., Song, S.H., Hao, M.Y., & Xie, M.Y. (2012) Dynamic changes of lactic acid bacteria during Chinese sauerkraut fermentation. *Food Control*, 26, 178-181.
- Xiong, T., Li, X., Guan, Q.Q., űng, F., & Xie, M.Y. (2014). Starter culture fermentation of Chinese sauerkraut: growth, acidification and metabolic analyses. *Food Control*, 41, 122-127.
- Xiong, T., Li, J., Liang, F., Wang, Y., & Guan, Q. (2016). Effects of salt concentration on Chinese sauerkraut fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 169-174.
- Wacher, C., Díaz-Ruiz, G., & Tamang, J.P. (2010). Fermented Vegetable Products. In: J.P. Tamang & K. Kailasapathy (Eds.). *Fermented Foods and Beverages of the World* (1^a ed.) (pp. 149-188). New York: CRC Press.
- Wagner, A.E., & Rimbach, G. (2009). Ascorbigen: chemistry, occurrence, and biologic properties. *Clinics in Dermatology*, 27(2), 217-224.
- Wendy, F., Ilenys, M., & Pérez, D. (2012). Role of selected oxidative yeasts and bacteria in cucumber secondary fermentation associated with spoilage of the fermented fruit. *Food Microbiology*, 32, 338-344.
- Williams, D.J., Edwards, D., Hammernig, I., Jian, L., James, A.P., Johnson, S.K., et al. (2013). Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: a review. *Food Research International*, 52, 323-333.
- Woods, J. (1851). *Botanical Gazette*, 3(27), 29.
- Wolkers-Rooijackers, J.C.M., Thomas, S.M., & Nout, M.J.R. (2013). Effects of sodium reduction scenarios on fermentation and quality of sauerkraut. *LWT - Food Science and Technology*, 54, 383-388.
- Wouters, D., Bernaert, N., Conjaerts, W., Droogenbroeck, B.V., Loose, M.D., & Vuyst, L.D. (2013). Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of spontaneous leek fermentations. *Food Microbiology*, 33, 185-196.
- Zabat, M.A., Sano, W.H., Wurster, J.I., Cabral, D.J., & Belenky, P. (2018). Microbial Community Analysis of Sauerkraut Fermentation Reveals a Stable and Rapidly Established Community. *Foods*, 7, 77.
- Zhao, D.Y., & Ding, X.L. (2008). Studies on the low-salt Chinese potherb mustard (*Brassica juncea*, Coss.) pickle. 1-the effect of a homofermentative L(+)-lactic acid producer *Bacillus coagulans* on starter culture in the low-salt Chinese potherb mustard pickle fermentation. *LWT – Food Science and Technology*, 41, 474-482.

ANEXOS

ANEXO I

Mestrado em Ciências Gastronómicas

Análise Sensorial de Couve ácida fermentada

Nome: _____

Idade: _____ Data: _____

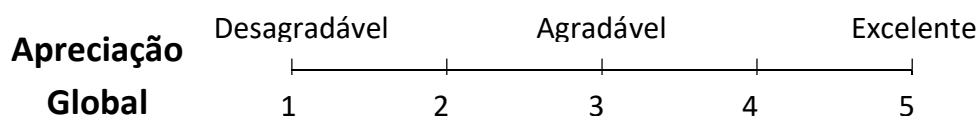
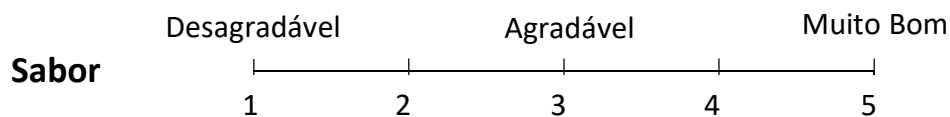
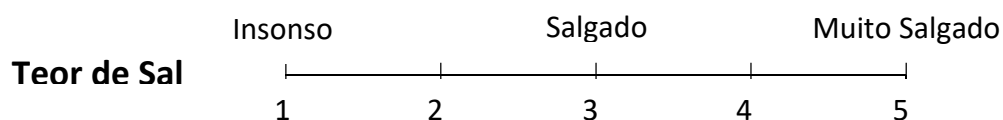
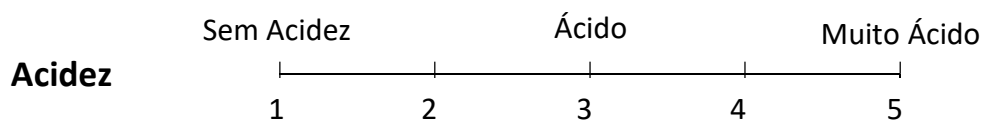
O Chouxcroute é uma couve ácida resultante da fermentação ácido-láctica de folhas de repolho (*Brassica oleracea L.*), por adição direta de sal. O seu consumo está associado a benefícios para a saúde, porque comparativamente com a couve não fermentada é mais rico em minerais, Ca, P, Fe, Na e K, em compostos fenólicos e tem teores elevados de Vitamina B e C.

Hoje em dia, o consumo de sal é muito elevado, o que aumenta os riscos de hipertensão e de doenças cardiovasculares. As autoridades de saúde sugerem a redução da ingestão de sódio, e a reformulação de produtos alimentares com menores quantidades deste mineral. Estudos recentes indicam que é possível produzir Chouxcroute com menores quantidades de sódio, substituindo-o por outros minerais como o K, Ca e Mg.

Foi definido como objetivo central deste trabalho, produzir uma couve ácida substituindo o sal por *Salicornia ramosissima*, uma planta halófito, composta maioritariamente por água, rica em fibra, proteína, ácidos-gordos poli-insaturados, aminoácidos essenciais e em micronutrientes (Na, Mg, Ca, K e P).

Anote os códigos das amostras que recebeu de acordo com a posição no tabuleiro, observe, prove, avalie e anote as características indicadas de acordo com cada uma das escalas de 1 a 5 na tabela abaixo. Uma das amostras é um produto adquirido no mercado.

Aspeto	Desagradável	Agradável	Muito Bom	
	1	2	3	4
Cor	Desagradável	Agradável	Muito Bom	
	1	2	3	4
Cheiro	Desagradável	Agradável	Muito Bom	
	1	2	3	4



Atributos	Amostras			
Aspetto				
Cor				
Cheiro				
Dureza				
Acidez				
Teor de sal				
Sabor				
Apreciação global				

Qual a amostra adquirida no comércio: _____

Observações: _____

ANEXO II

Fermentation of *Brassica oleraceae* L. with the halophyte plant *Salicornia ramosissima* L.

Patrícia Pires-Cabral^{1,2}, Paula Pires-Cabral³, Célia Quintas³

¹Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Campus da Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal

²Universidade de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal

³Universidade do Algarve, Instituto Superior de Engenharia, Campus da Penha, Centre for Mediterranean Bioresources and Food (MeditBio), Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal



INTRODUCTION

The fermentation of white cabbage (*Brassica oleraceae* L.) into sauerkraut traditionally occurs in the presence of 2-2.5% NaCl. NaCl is a key element in the processing, as it enhances the diffusion of nutrients out of the plant cells, thus increasing the rate of fermentation, prevents the growth of foodborne pathogens and some spoilage microorganisms, and selectively allows the multiplication of lactic acid bacteria population [1]. Nowadays, consumers prefer to lower the sodium intake, due to its negative impact on health, which has led to several research studies aiming to replace NaCl, totally or partially, with other salts/ingredients. In the case of sauerkraut production salt mixtures of NaCl, KCl, MgCl₂ and CaCl₂ were tested successfully [2,3].

The aim of the present study was to produce a fermented white cabbage using the halophyte plant rich in salt, *Salicornia ramosissima*, as a substitute of NaCl, and evaluate its effect on the fermentation profile (pH, acidity and microbiota) and on its final sensorial characteristics.

MATERIAL AND METHODS

The white cabbage (*Brassica oleraceae* L.) and the table salt were purchased from a local supermarket.

The salicornia (*Salicornia ramosissima* L.) was kindly provided by the company

Riafresh, Verduras da Ria Formosa (Agro-On, Lda.).



Three fermentation trials of white cabbage (A, B and C) were done (in 4 replicates), in closed containers, in the absence of air, at 20 °C, for 20 days:

A – experiment using 2.9% NaCl (~1.1% Na) (Control)

B - experiment using NaCl and *S. ramosissima* with 1.9% salt (~0.48% Na)

C - experiment using *S. ramosissima* with 1.6% salt (~0.34% Na)

Changes of pH, total acidity and microbiota were measured during the fermentations. At the end, the sauerkraut products were analyzed for organoleptic characteristics.

RESULTS AND DISCUSSION

□ Fermentation Profile of White Cabbage

Throughout the fermentation

- **pH Decrease** (3.7 - 4)
- **Acidity Increase** (0.8 – 1.1%)

➤ Increase

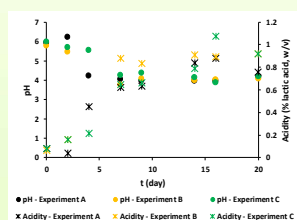
Lactic Acid Bacteria

Aerobic Mesophilic Microorganisms

➤ Decrease and Disappearance

Filamentous Fungi and Yeasts

Coliforms

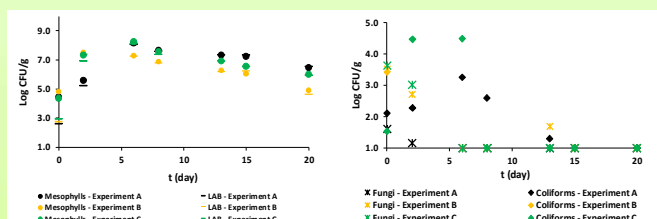


➤ Not detected

Escherichia coli

Staphylococcus aureus

Salmonella sp.



□ Sensory Evaluation of the Sauerkraut Products

After 20 days of fermentation

✓ No significant differences

Acidity, Aroma, Color

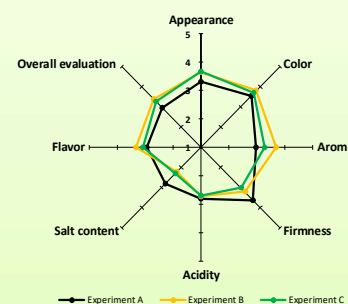
Appearance, Flavor

Overall evaluation

✓ Significantly different

Firmness

Salt content



➤ Experiment A - White cabbage fermented with NaCl (1.1% Na)

Sauerkraut A was the **saltiest** and had the **harder texture**

➤ Experiment B - White cabbage fermented with NaCl and *S. ramosissima* (0.48% Na)

Sauerkraut B was the **less salty**

➤ Experiment C - White cabbage fermented with *S. ramosissima* (0.34% Na)

Sauerkraut C had the **softest texture**



CONCLUSION

The fermentation of *Brassica oleraceae* L. using NaCl and *Salicornia ramosissima* L. (**experiment B**) or *S. ramosissima* (**experiment C**) resulted in sauerkraut products with **similar final quality** as the control sauerkraut (**experiment A**), regarding physicochemical, microbial and sensorial **characteristics**, with a reduction of Na content.

References: [1] <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421> [2] <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.07.009> [3] <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.07.002>